

Der Einfluss von *advanced glycation end-products*
auf die podozytäre Expression des nuklearen Inhibitors
der Proteinphosphatase 1

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät

der Friedrich-Schiller- Universität Jena



von Dipl.-Biol. **Marita Liebisch**

geboren am 07. Februar 1984 in Jena

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Gunter Wolf, MHBA; Klinik für Innere Medizin III, Universitätsklinikum Jena
2. Prof. Dr. med. Tilman Grune; Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena
3. Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Benzing; Klinik II für Innere Medizin, Uniklinik Köln

Tag der öffentlichen Verteidigung: 18.09.2013

Inhaltsverzeichnis

<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	V
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	VIII
<i>Tabellenverzeichnis</i>	X
<i>Zusammenfassung</i>	XI
<i>Summary</i>	XIII
1. Einleitung	1
1.1. <i>Advanced glycation end-products</i> (AGEs).....	1
1.1.1. Bildung und Wirkung der AGEs	1
1.1.2. RAGE - ein Rezeptor für AGEs.....	5
1.2. Die Niere	7
1.2.1. Aufbau und Funktion der Niere	7
1.2.2. Diabetische Nephropathie.....	9
1.3. Die Podozyten	11
1.3.1. Podozyten und ihre Funktion bei der glomerulären Filtration	11
1.3.2. Podozytopathien	14
1.4. Der nukleare Inhibitor der Proteinphosphatase 1 (NIPP1).....	16
1.4.1. NIPP1: Struktur und Funktionsweise	16
1.4.2. Proteinphosphatase 1	20
1.5. Zielsetzung der Arbeit.....	23

2. Materialien und Methoden.....	24
2.1. Materialien.....	24
2.1.1. Oligonukleotide und Real-Time PCR-Programme	27
2.1.2. Primäre und sekundäre Antikörper	28
2.2. Methoden	29
2.2.1. Kultivierung der murinen Podozyten	29
2.2.2. Herstellung von AGE-BSA	30
2.2.3. Transfektion mit NIPP1 siRNS	31
2.2.4. Analyse der Laktat-Dehydrogenase-Aktivität	32
2.2.5. RNS-Isolierung und reverse Transkription	33
2.2.6. Real-Time PCR (RT PCR)	34
2.2.7. Proteinisolierung	35
2.2.8. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE), Western Blot und Immundetektion	36
2.2.9. Proteindetektion durch Immunfluoreszenzfärbung und Immuncytochemie	38
2.2.10. Analyse der PP1-Phosphatase-Aktivität	40
2.2.11. Bestimmung der zellulären Proliferationsrate	40
2.2.12. Quantifizierung der zellulären Hypertrophie.....	41
2.2.13. Zellzyklusanalyse durch Propidiumjodid-Färbung	42
2.2.14. Messung von Apoptose	43
2.2.15. Blockierung von RAGE	44

2.2.16.	NF κ B-Promotorassay	44
2.2.17.	Genotypisierung der <i>db/db</i> -Mäuse.....	45
2.2.18.	Analyse der glomerulären NIPP1-Expression in diabetischen Mäusen	46
2.2.19.	Statistische Analysen.....	47
3.	Ergebnisse	48
3.1.	Einfluss von AGE-BSA auf die Expression des nuklearen Inhibitors von PP1 (NIPP1)	48
3.2.	Einfluss von AGE-BSA auf die Proteinphosphatase 1	51
3.2.1.	Expression von PP1 in den Podozyten bei Behandlung mit AGE-BSA.	51
3.2.2.	Einfluss der verminderten Expression von NIPP1 auf die PP1- Enzymaktivität	53
3.3.	Suppression der NIPP1-Expression mithilfe von siRNS Transfektion	55
3.3.1.	Analyse der Stabilität der transienten Transfektion	55
3.3.2.	Effekt der NIPP1 siRNS Transfektion auf die PP1-Expression und - Aktivität	57
3.4.	Messung der zellulären Toxizität	60
3.5.	Einfluss der NIPP1-Suppression auf pathophysiologische Vorgänge in den Podozyten	61
3.5.1.	Relevanz der NIPP1-Suppression für die zelluläre Proliferation	62
3.5.2.	Stellenwert der verminderten NIPP1-Expression bei der zellulären Hypertrophie	65

3.5.3. Bedeutung der NIPP1-Suppression für das Zellzyklus-geschehen in den Podozyten	67
3.5.4. Analyse der Podozyten auf Apoptose bei Suppression von NIPP1	69
3.6. Rolle von RAGE bei der Suppression von NIPP1.....	73
3.7. Einfluss der NIPP1-Suppression auf RAGE-Signal-transduktionsprozesse in Podozyten	74
3.8. Analyse der NIPP1-Proteinexpression in den Podozyten von diabetischen Mäusen	77
4. Diskussion.....	80
5. Literaturverzeichnis	91
<i>Eidesstattliche Erklärung</i>	XV
<i>Danksagung</i>	XVI

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm	DM	<i>Diabetes mellitus</i>
µl	Mikroliter	DN	Diabetische Nephropathie
µM	Mikromolar	DNS	Desoxyribonukleinsäure
A	Absorption (in nm)	E2F	<i>E2-Promotor Binding Factor</i>
ADP	Adenosindiphosphat	EED	<i>embryonic ectoderm development</i>
AEC	Aminoethylcarbozol	ELISA	<i>Enzym-linked Immunosorbent Assay</i>
AGE	<i>advanced glycation end-products</i>	EZH2	<i>enhancer of zeste homolog 2</i>
AKAP	<i>A-kinase anchor protein</i>	FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
ATP	Adenosintriphosphat	FHA	<i>forkhead-associated domain</i>
BrdU	5-Bromo-2'-Desoxyuridin	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	FKS	fötales Kälberserum
bp	Basenpaar	g	Gramm
C-Terminus	Carboxy-Terminus	G	<i>gap</i>
CDC5L	<i>cell division cycle 5-like protein</i>	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
CDK	Cyclin-abhängige Kinase	GBM	glomeruläre Basalmembran
Ck2	Caseinkinase 2	GFB	glomeruläre Filtrationsbarriere
CKI	Cyclin-abhängige Kinaseinhibitoren	GTP	Guanosintriphosphat
CML	(3, 4)N ^ε -(Carboxymethyl)lysin	h	Stunde
Co-BSA	Kontroll-BSA	HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
CPI-17	<i>C-kinase potentiated PP1 inhibitor 17 kDa</i>		
C_T	<i>cycle threshold</i>		
Cy3	Cyan 3		
DAB	3,3'-Diaminobenzidin		
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol		

HRP	<i>horse radish peroxidase</i>	ng	Nanogramm
I₁	Inhibitor-1	NIPP1	<i>nuclear inhibitor of PP1</i>
ICC	Immuncytochemie	nM	Nanomolar
IF	Immunfluoreszenz	nm	Nanometer
Ig	Immunglobulin	p-Wert	Signifikanzwert; p= <i>probability</i>
IκB	Inhibitor von NFκB	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
kb	Kilobase	PcG	<i>Polycomb group</i>
kDa	Kilo-Dalton	PCR	Polymerasekettenreaktion
Kip	<i>kinase inhibitory protein</i>	pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
l	Liter	PHAP-I	<i>putative HLA-associated protein-I</i>
LDH	Laktat-Dehydrogenase	PI	Propidiumjodid
M	<i>mitosis</i>	PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
mg	Milligramm	PKA	Proteinkinase A
min	Minute	pM	Picomolar
ml	Milliliter	PMSF	Phenylmethanesulfonylfluorid
mM	Millimolar	PNUTS	<i>PP1-nuclear targeting subunit</i>
MPC	<i>mouse podocyte clone</i>	POD	Peroxidase
mRNS	<i>messenger RNS</i>	PP1	Proteinphosphatase 1
ms	Millisekunde	pRb	Retinoblastom-Protein
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium	PRC	<i>Polycomb Repressive Complex</i>
MYPT1	<i>myosin phosphatase target subunit 1</i>	RAGE	Rezeptor für AGE
N-Terminus	Amino-Terminus	rcf	<i>relative centrifugal force</i>
NAD(P)H	Nikotinamidadenindinukleotid(phosphat)	RNS	Ribonukleinsäure
RT PCR	Real-Time PCR	ROS	reaktive Sauerstoffspezies
NFκB	<i>nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells</i>	RPMI	Roswell Park Memorial Institut
		RT	Raumtemperatur
		RVxF	Arginin-Valin-x-Phenylalanin
		s	Sekunde

S	<i>synthesis</i>
SAP155	<i>Sit4 associated protein 155</i>
SDS- PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate- Polyacrylamid Gelelektrophorese</i>
siRNS	<i>small interfering RNS</i>
src	<i>sarcoma</i>
T1DM	<i>Typ 1 Diabetes mellitus</i>
T2DM	<i>Typ 2 Diabetes mellitus</i>
TGFβ	<i>transfroming growth factor β</i>
Thr	<i>Threonin</i>
TNFα	<i>tumor necrosis factor α</i>
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
U	<i>Units</i>
UV	<i>Ultraviolet</i>
V	<i>Volt</i>

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Bildung von <i>advanced glycation end-products</i> über die Maillard Reaktion....	2
Abb. 2: Struktur von CML und Pentosidin.....	3
Abb. 3: Schematische Darstellung der RAGE-vermittelten NF κ B-Aktivierung.....	6
Abb. 4: Schematische Darstellung eines Glomerulus.....	8
Abb. 5: Schematische Darstellung der glomerulären Filtrationsbarriere.....	9
Abb. 6: Darstellung der einzelnen Phasen des Zellzyklus.....	13
Abb. 7: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Podozyten eines gesunden (links) und eines geschädigten Glomerulus (rechts bei DN).	15
Abb. 8: NIPP1-Domänenstruktur.....	18
Abb. 9: Proteinsequenz- <i>Alignment</i> der humanen PP1-Isoformen.....	21
Abb. 10: Immuncytochemischer Nachweis von Synaptopodin.....	30
Abb. 11: Repräsentatives Agarosegel für die Genotypisierung der <i>db/db</i> -Tiere.....	46
Abb. 12: RT PCR Analyse der NIPP1-mRNS-Expression bei Behandlung der Podozyten mit AGE-BSA.....	48
Abb. 13: NIPP1-Proteinexpression in den Podozyten bei Behandlung mit AGE-BSA.....	50
Abb. 14: Analyse der PP1-mRNS-Expression AGE-BSA behandelter Podozyten...	51
Abb. 15: Einfluss von AGE-BSA auf die PP1-Proteinexpression in den Podozyten.	52
Abb. 16: Einfluss von AGE-BSA auf die Phosphatase-Aktivität von PP1.....	54
Abb. 17: Analyse der NIPP1-Expression nach Transfektion mit NIPP1 siRNS.....	57
Abb. 18: Einfluss der NIPP1-Suppression auf die Expression von PP1.....	59

Abb. 19: Analyse der PP1-Phosphatase-Aktivität bei Transfektion mit NIPP1 siRNS.	59
Abb. 20: Analyse der LDH-Aktivität.....	61
Abb. 21: Analyse der BrdU-Inkorporationsrate in die DNS der Podozyten.	63
Abb. 22: Beurteilung der zellulären Proliferationsrate über die Analyse der Zellzahl.	64
Abb. 23: Messung der zellulären Hypertrophie.	66
Abb. 24: Proteinexpression des Zellzyklusmarkers p27 ^{Kip1}	67
Abb. 25: Analyse des Zellzyklusverhaltens der Podozyten mit dem FACS.	69
Abb. 26: Messung von Apoptose mit dem TUNEL Assay.....	70
Abb. 27: Messung von Apoptose und Nekrose mit dem Annexin-V Assay mithilfe des FACS.....	72
Abb. 28: Blockade von RAGE über einen murinen RAGE-Antikörper.	74
Abb. 29: Immuncytochemische Untersuchung der RAGE-Proteinexpression.....	75
Abb. 30: Analyse der transkriptionellen Aktivität von NFκB.	77
Abb. 31: IF Analyse der NIPP1-Proteinexpression in diabetischen <i>db/db</i> -Mäusen..	78
Abb. 32: Hypothetische Darstellung der AGE-vermittelten NIPP1-Suppression in differenzierten Podozyten.	87

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Für die Zellkultur genutzte Reagenzien.....	24
Tab. 2: Substanzen für molekularbiologische Arbeiten.	24
Tab. 3: Allgemeine Chemikalien und Reagenzien.....	25
Tab. 4: Verbrauchsmaterialien.	26
Tab. 5: Auflistung der Geräte.	26
Tab. 6: Verwendete Computerprogramme.	27
Tab. 7: Sequenzen der verwendeten murinen Primerpaare.....	27
Tab. 8: Überblick über die eingesetzte siRNS.....	28
Tab. 9: Primäre Antikörper.	28
Tab. 10: Sekundäre Antikörper.	28
Tab. 11: CML- und Pentosidin-Konzentration von Co-BSA und AGE-BSA.....	31
Tab. 12: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE.	36

Zusammenfassung

Advanced glycation end-products (AGEs) entstehen in der Maillard-Reaktion über die nicht-enzymatische Glykierung von Proteinen durch reduzierende Zucker. Sie üben ihre pathophysiologischen Effekte Rezeptor-unabhängig und auf Rezeptor-abhängigen Signalwegen aus. Als Rezeptor für AGEs ist vor allem RAGE von Belang. Der *Diabetes mellitus* ist mit einer Hyperglykämie assoziiert, welche die Bildung und Akkumulation von AGEs stimuliert. Die erhöhte AGE-Belastung im Serum sowie lokal kann Nierenzellen wie die Podozyten schädigen. Podozyten sind glomeruläre Zellen, die eine große Bedeutung bei dem Aufbau der glomerulären Ultrafiltrationsbarriere und der glomerulären Struktur besitzen. Differential Display Analysen zeigten, dass die Inkubation muriner, konditional differenzierter Podozyten mit glykiertem Albumin (AGE-BSA) im Vergleich zu der Kontrolle (Co-BSA) die Expression diverser Gene beeinflusst, darunter das für NIPP1, den nuklearen Inhibitor der Proteinphosphatase 1 (PP1). Real-Time PCR, Western Blot und Immuncytochemie zeigten eine signifikant verminderte NIPP1 mRNA- und Proteinexpression bei Behandlung der Podozyten mit AGE-BSA. Diese verminderte NIPP1-Proteinexpression ist ausschlaggebend für die erhöhte Aktivität der Proteinphosphatase 1 bei der Inkubation der Podozyten mit AGE-BSA, da keine Änderung in der Proteinexpression von PP1 beobachtet werden konnten. Die Relevanz der *in vitro* Daten konnte *in vivo* belegt werden. Die immuncytochemische Untersuchung von NIPP1 in den Podozyten diabetischer Mäuse (*db/db*) verdeutlichte eine signifikant geringere NIPP1-Expression in den *db/db*-Tieren im Vergleich zu den nicht diabetischen Kontroll-*db/m*-Mäusen. Die Blockade von RAGE zeigte, dass die beobachtete NIPP1-Suppression in kultivierten Podozyten durch die AGE-RAGE Interaktion initiiert wird. Mit NIPP1 siRNA transfizierte Podozyten wiesen eine signifikant gesteigerte Aktivität des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF κ B und eine erhöhte mRNA-Expression von TNF α auf. Um zu analysieren, welche funktionelle Bedeutung die NIPP1-Suppression bei den AGE-bedingten, pathophysiologischen Veränderungen der Podozyten besitzt, wurden die Zellen mit NIPP1 siRNA transfiziert. Diese Untersuchungen zeigten, dass die Unterdrückung

von NIPP1 eine erhöhte p27^{Kip1}-Proteinexpression und einen Arrest der Podozyten in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus induziert, assoziiert mit einem hypertrophen Phänotyp der Podozyten, was eine typische Veränderung der frühen Diabetischen Nephropathie ist.

Zusammenfassend zeigen die Befunde eine AGE/RAGE-abhängige NIPP1-Suppression in den Podozyten im Zusammenhang mit einer erhöhten Aktivität von PP1. Diese Beobachtungen könnten für ein besseres Verständnis der Pathophysiologie der Diabetischen Nephropathie von Bedeutung sein und möglicherweise zur Entwicklung von innovativen Therapieansätzen beitragen.

Summary

Advanced glycation end-products (AGEs) are generated in the Maillard reaction by non-enzymatic glycation of proteins by reducing sugars. They exhibit pathophysiological effects via receptor-independent and receptor-dependent pathways. Of particular importance is the receptor for AGEs RAGE. *Diabetes mellitus* is associated with hyperglycemia that induces the formation and accumulation of AGEs. The increased AGE exposition in serum and locally can damage renal cells such as podocytes. Podocytes are glomerular cells that play an important role in the organization of the glomerular ultrafiltration barrier and the glomerular structure. Differential Display analysis showed that incubation of murine, conditionally differentiated podocytes with glycated albumin (AGE-BSA) affects the expression of different genes compared with the non-glycated control BSA (Co-BSA), among them NIPP1, the nuclear inhibitor of protein phosphatase 1 (PP1). Real-time PCR, Western blot and immunocytochemistry demonstrated a significant reduced NIPP1 mRNA and protein expression by incubation of podocytes with AGE-BSA. The decrease in NIPP1 protein promotes a stimulated activity of PP1, however no direct change in PP1 protein expression by AGE-BSA was observed. The meaning of *in vitro* data was confirmed *in vivo*. Immunocytochemistry demonstrated a significant reduced NIPP1 protein expression in the podocytes of diabetic mice (*db/db*) compared with the non-diabetic control *db/m* animals. Blocking RAGE revealed that AGE/RAGE interaction is responsible for the observed suppression of NIPP1 in cultured podocytes. Transfection of podocytes with NIPP1 siRNA caused a significant increased activity of the proinflammatory transcription factor NF κ B and an elevated mRNA expression of TNF α . The impact of NIPP1 suppression for the pathophysiological consequences induced by AGE in podocytes was analyzed by transfection of cells with NIPP1 siRNA. These studies showed that down-regulation of NIPP1 stimulated an increased protein expression of p27^{Kip1} and the arrest of podocytes in G₀/G₁ phase of the cell cycle associated with a hypertrophic phenotype of podocytes, a typical alteration in early diabetic nephropathy.

In summary the results emphasize an AGE/RAGE dependent suppression of NIPP1 in podocytes in association with an increased PP1 activity. The studies are likely crucial for a better understanding of the pathophysiology of diabetic nephropathy and may eventually lead to the development of innovative therapeutic approaches.

1. Einleitung

1.1. *Advanced glycation end-products* (AGEs)

1.1.1. Bildung und Wirkung der AGEs

Louis-Camille Maillard beschrieb 1912 erstmals die Entstehung gelb-brauner Substanzen bei der Erwärmung wässriger Aminosäurelösungen in Anwesenheit reduzierender Zucker. Dieser heute als Maillard-Reaktion bezeichnete Prozess ist Grundlage für die Entstehung von AGEs (*advanced glycation end-products*), bei welchem freie Aminogruppen von Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren nicht-enzymatisch durch zum Beispiel Glukose glykiert werden [1-4]. Die dabei ablaufenden Vorgänge sind sehr komplex und konnten im Detail noch nicht vollständig geklärt werden. Bei der klassischen nicht-enzymatischen Glykierung von Proteinen reagieren reduzierende Zuckermoleküle mit dem N-terminalen Aminosäurerest bzw. der ε -Aminogruppe von Proteinen und initial entsteht eine Schiff'sche-Base (Aldimin), deren Bildung relativ schnell erfolgt, aber auch hoch reversibel ist [1-3]. Durch Umlagerungen wird das stabilere Amadori-Zwischenprodukt (Ketoamin) generiert, dessen Rückbildung deutlich langsamer erfolgt als seine Entstehung [1, 5]. Infolge von Degradationen dieser Substanzen und folgenden Enolisations- und Eliminationsprozessen werden intermediäre, reaktive α -Dicarbonyle wie zum Beispiel 3-Deoxyglucoson, Glyoxal und Methylglyoxal gebildet [6, 7]. Diese Prozesse werden durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) verstärkt. Die so induzierte Generierung und Akkumulation reaktiver Carbonylverbindungen wird in der Literatur allgemein als Carbonylstress bezeichnet [5, 8]. Im letzten Schritt der Maillard-Reaktion reagieren die Intermediate mit vorwiegend Lysin- und/oder Argininresten von Proteinen und bedingen so die irreversible Bildung der AGEs (**Abb. 1**) [2, 3, 6]. Die dabei ablaufenden chemischen Reaktionen verursachen unumkehrbare Vernetzungen [9].

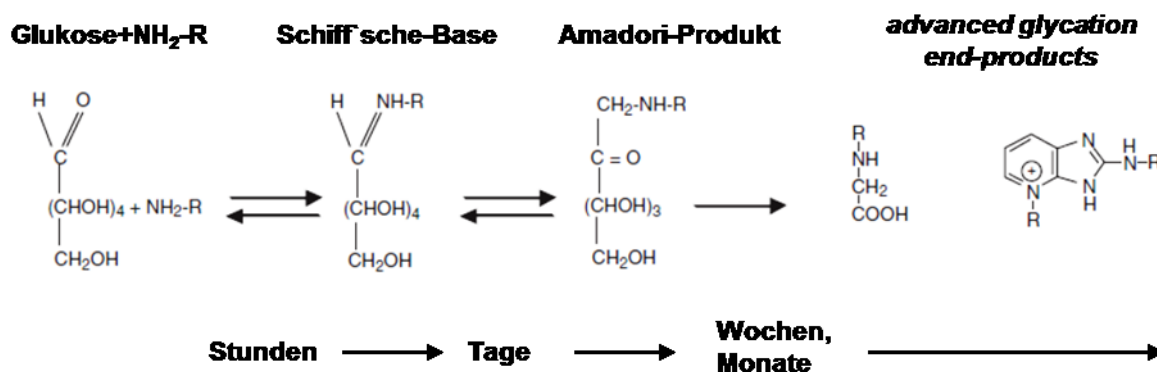


Abb. 1: Bildung von *advanced glycation end-products* über die Maillard Reaktion.

Die Abbildung zeigt die prinzipiellen Schritte, die bei der Entwicklung von AGEs ablaufen; modifiziert nach [2].

Die AGE-Bildung *in vivo* ist eine spontane Reaktion und abhängig von der Halbwertszeit des chemisch modifizierten Moleküls, der Zeit und der Zuckerkonzentration [1, 9, 10]. Die Maillard-Reaktion ist somit eine unabdingbare Folge von erhöhten Glukose-Spiegeln [11]. AGEs sind eine komplexe und heterogene Gruppe von Molekülen, die *in vivo* intrazellulär und extrazellulär entstehen [12]. Sie werden im Wesentlichen in drei Gruppen unterteilt: fluoreszierende *Crosslinking*-AGEs, nicht fluoreszierende *Crosslinking*-AGEs und nicht-*Crosslinking*-AGEs [1, 13]. Neben Glukose sind auch andere, intrazelluläre Zucker und Kohlenhydratderivate wie beispielsweise Fruktose, Threose, Glukose-6-Phosphat oder Glycerinaldehyd-3-Phosphat in die AGE-Bildung involviert [1, 5]. Glukose besitzt die niedrigste Glykierungsrate und hat sich aufgrund seiner geringen Reaktivität in der Evolution als freier Zucker *in vivo* durchgesetzt [1, 14].

Die Präkursormoleküle der AGE-Bildung entstehen jedoch nicht nur als Intermediate aus Schiff'schen-Basen oder Amadori-Produkten, sondern auch durch die Autooxidation von Kohlenhydraten in Anwesenheit von Transitionsmetallen oder von molekularem Sauerstoff [1, 15]. Die intrazelluläre Generierung von AGEs verursacht über die Bildung von ROS oxidativen Stress [5, 6, 16, 17]. Die in Verbindung mit der Glykierung stattfindende Oxidation wird allgemein als Glyoxidation bezeichnet [1, 2, 8, 10].

In vivo werden nicht wie ursprünglich angenommen nur langlebige, sondern auch Proteine mit relativ kurzer Halbwertszeit glykiert. Dies kann veränderte Enzymaktivitäten, eine verminderte Abbaurate und abnormale Liganden-Rezeptor-Interaktionen zur Folge haben [1, 10]. Die AGE-Bildung an langlebigen Proteinen verändert hingegen mehr die strukturellen, mechanischen und funktionellen Eigenschaften des betroffenen Gewebes [5, 6].

Neben der im Körper gebildeten AGEs spielen auch exogene, mit der Nahrung oder dem Tabakrauch aufgenommene AGEs eine Rolle [6, 18]. Dabei sind vor allem die in der Lebensmittelindustrie durch Erhitzen von konservierten oder mit Farb- und Geschmacksstoffen versetzten Nahrungsmittel von Bedeutung [6, 19]. Von den exogen aufgenommenen AGEs werden nur etwa 10% im Gastrointestinaltrakt adsorbiert und davon etwa ein Drittel über den Urin ausgeschieden [10, 20]. Die restlichen zwei Drittel können in die AGE-vermittelte Pathogenese chronischer Erkrankungen wie des *Diabetes mellitus* involviert sein [6, 10].

Prominente und gut charakterisierte AGE-Vertreter sind Pentosidin und (3, 4) N^{ϵ} -(Carboxymethyl)lysin (CML) (**Abb. 2**) [6, 9, 13].

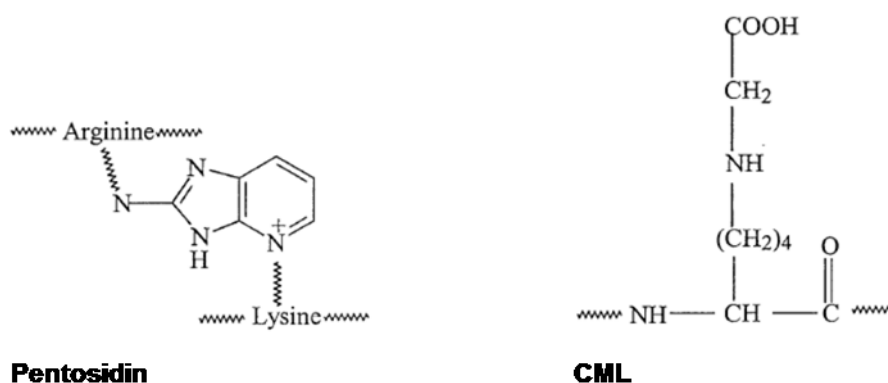


Abb. 2: Struktur von CML und Pentosidin.

Der Abbildung ist die chemische Struktur von Pentosidin und CML zu entnehmen [6]; CML = (3, 4) N^{ϵ} -(Carboxymethyl)lysin.

Bis zu 90% ihres Vorkommens sind an Serumalbumin gebunden [5]. Beide Substanzen werden über verschiedene Wege und aus mehr als einem Kohlenhydrat- bzw. Vorläufermolekül gebildet. Im Gegensatz zu CML gehört das Pentosidin zu den fluoreszierenden AGEs. Als Beispiel für ein reines Glykierungsprodukt sei an dieser Stelle das Imidazolon erwähnt [3, 5].

Den AGEs steht *in vivo* ein komplexes Rezeptorsystem gegenüber, das im Wesentlichen in zwei Kategorien unterteilt wird: zum einen ist eine Gruppe AGE-bindender Rezeptoren beschrieben, die AGE-modifizierte Proteine katabolisieren und degradieren, sodass sie vom Körper ausgeschieden werden können [2, 3, 6]. Dazu gehören unter anderem der AGE-Rezeptor-Komplex und die Makrophagen-*Scavenger*-Rezeptoren [2, 10, 21-27]. Zum anderen induziert die Bindung von AGEs an bestimmte Rezeptormoleküle Signalkaskaden, die zu der Aktivierung der Zellen führen und so zur verstärkten Ausbildung diabetischer Komplikationen beitragen. Von zentraler Bedeutung ist hier der Rezeptor für AGEs: RAGE [1, 2, 28].

Unter physiologischen Bedingungen akkumulieren AGEs langsam, wobei sich dieser Prozess mit zunehmendem Alter verstärkt [5, 9]. AGEs sind in vielen Geweben nachzuweisen [5, 6]. Auch renale Strukturen wie die Basalmembranen, das Mesangium, endotheliale Zellen, Podozyten und Tubuluszellen sind für eine AGE-Akkumulation besonders empfänglich [5, 29, 30]. Die Bildung und Akkumulation von AGEs ist in inflammatorischen Bereichen, bei Nierenversagen, Hyperglykämie und oxidativem Stress erhöht [31]. Das macht die AGEs zu einer der Hauptursachen vieler chronischer Erkrankungen wie des *Diabetes Mellitus* [5, 12, 32, 33]. Sowohl humane als auch Tier-experimentelle Studien der Diabetischen Nephropathie (DN) zeigten eine vermehrte AGE-Lokalisation in den einzelnen Kompartimenten der Niere. Die AGE-Konzentrationen im Serum korrelieren dabei mit dem Grad der DN [6, 29, 30, 34-41].

1.1.2. RAGE - ein Rezeptor für AGEs

RAGE wurde 1992 als Rezeptor für AGEs beschrieben [42], der bei diversen metabolischen Erkrankungen wie dem *Diabetes mellitus* eine Rolle spielt [5, 11, 42]. Der Rezeptor gehört zu der Klasse der Immunglobulin (Ig)-Superfamilie und besitzt deren charakteristische Domänenstruktur. Er setzt sich aus drei am N-Terminus lokalisierten, Ig-ähnlichen Regionen zusammen: einer V (*variable*)-Typ- und zwei C (*constant*)-Typ-Domänen. Daneben besitzt er eine Transmembrandomäne und eine kurze zytoplasmatische Domäne, die stark geladen ist und über welche intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden aktiviert werden [11, 31, 43-45]. Neben der „full-length“ Membran-gebundenen Form existieren weitere durch Splicing oder Abspaltungen gebildete Rezeptorvarianten: eine Membran-gebundene Form ohne den intrazellulären Part (DN-RAGE; DN = *dominant negative*) und gekürzte (sRAGE) bzw. durch Splicing entstehende (esRAGE), lösliche Versionen [2, 31]. Diese binden auch die Liganden von RAGE und fungieren als Gegenspieler zu dem Rezeptor, da sie die Bindung der Liganden an den Membran-gebundenen RAGE verhindern und damit die Induktion von Signalkaskaden unterdrücken [2, 31, 46].

Inzwischen ist die Bezeichnung „Rezeptor für AGEs“ etwas irreführend, da der Multiligandenrezeptor neben den AGEs eine Vielzahl weiterer Moleküle bindet. Beispiele dafür sind Amyloid- β Peptide, Amyloid A, S100 Calgranulin und HMGB1 (*high mobility group protein* B1) [2, 11, 46]. Alle Liganden haben gemeinsam, dass sie an chronischen metabolischen, malignen und inflammatorischen Erkrankungen beteiligt sind [45]. Der Rezeptor entwickelt seine Ligandendiversität über die V-Typ-Domäne und erkennt dabei eher dreidimensionale Strukturen als die Aminosäuresequenz der Liganden. Er wird deswegen den „*pattern recognition receptors*“ zugeordnet [31, 46-48]. Obwohl seine physiologische Bedeutung noch nicht komplett geklärt werden konnte, ist bekannt, dass er eine bedeutende Rolle bei der Regulation von Immunreaktionen und der Inflammation einnimmt [2, 46, 49].

Je nach Liganden- und Zelltyp werden über die Bindung von RAGE diverse Signaltransduktionskaskaden in Gang gesetzt, die das Überleben der RAGE-produzierenden Zelle sichern sollen, die Produktion von ROS induzieren und/oder

inflammatorische Prozesse in Gang setzen [31, 45]. Die Aktivierung eines Großteils der Signalwege mündet über die Phosphorylierung und Degradation von I κ B (Inhibitor von NF κ B) in der Aktivierung von NF κ B (*nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells*) [31, 46, 50]. NF κ B induziert die Transkription verschiedener proinflammatorischer Moleküle wie TNF α und diverser Wachstumsfaktoren [46, 51]. Der Transkriptionsfaktor NF κ B vermittelt zudem seine eigene Genexpression und die von RAGE [46, 50]. Eine permanente Aktivierung von NF κ B bedingt über die *de novo*-Synthese von RAGE einen konstant wachsenden Pool an NF κ B, welcher letztendlich die Menge an neu synthetisiertem Inhibitor I κ B übersteigt (**Abb. 3**) [31, 46].

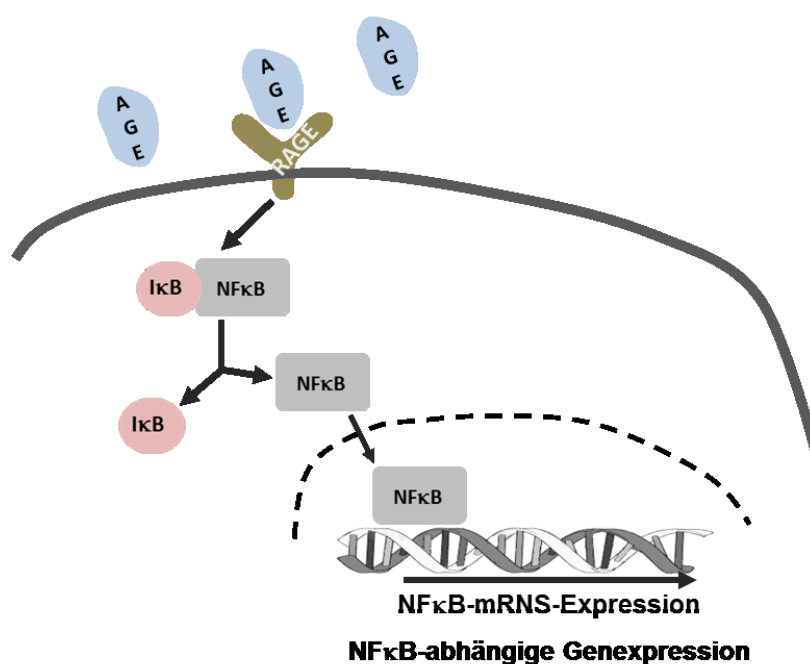


Abb. 3: Schematische Darstellung der RAGE-vermittelten NF κ B-Aktivierung.

Die Ligandenbindung an RAGE induziert den Abbau des Inhibitors von NF κ B (I κ B) und so die Translokation von NF κ B in den Zellkern. Dort aktiviert der Transkriptionsfaktor die Expression einer Reihe von Genen, unter anderem seine eigene und die von RAGE; modifiziert nach [46]. AGE = *advanced glycation end-product*, NF κ B = *nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells*.

So induzieren AGEs über die Bindung an RAGE und die persistente Aktivierung von NF κ B den Übergang von einer kurz andauernden inflammatorischen Reaktion zu einer chronischen zellulären Aktivierung, die mit ursächlich für den inflammatorischen Phänotyp vieler chronischen Erkrankungen ist [31, 46, 52].

RAGE wird im adulten Zustand bei Homöostase in den meisten Zelltypen nicht konstitutiv exprimiert. Der Rezeptor wird vermehrt bei Akkumulation seiner Liganden gebildet. So ist er vor allem in pathologischen Situationen hochreguliert [11, 31, 45]. Unter physiologischen Bedingungen wird RAGE in der Niere in erster Linie von den Podozyten exprimiert, wobei die RAGE-Expression unter diabetischen Konditionen steigt [5, 28, 41, 53]. Untersuchungen an RAGE^{-/-}-Mäusen (*Knockout*-Tiere mit einer Deletion in beiden Allelen des Gens für RAGE) belegen, dass die Tiere unter physiologischen Konditionen sowohl lebensfähig sind als auch eine normale Lebensspanne zeigen. Phänotypische Unterschiede zum Wildtyp treten erst nach bestimmten Stressfaktoren wie der Induktion von Diabetes zu Tage. Die Tiere zeigen dann einen deutlich abgeschwächten Verlauf hinsichtlich der Entwicklung pathophysiologischer Merkmale einer DN im Vergleich zu diabetischen Wildtyp-Mäusen [13, 28, 46, 54, 55]. Die Überexpression des Rezeptors im Mausmodell resultiert in typischen strukturellen und funktionellen Veränderungen der DN [13, 56].

1.2. Die Niere

1.2.1. Aufbau und Funktion der Niere

Die Niere ist ein Organ des Harnsystems. Ihre Aufgabe besteht in der Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen, der Aufrechterhaltung der Homöostase von z.B. Na⁺, K⁺, Phosphat oder HCO₃⁻ und sie ist in den Metabolismus von Proteinen, Peptidhormonen, Toxinen und anderen Substanzen involviert. Als endokrines Organ besitzt sie durch Synthese und Sekretion von Erythropoetin, Renin und aktivem Calcitriol zudem Einfluss auf die Blutdruckregulation, Erythropoese und den Knochenstoffwechsel. Die funktionelle Grundeinheit ist das Nephron, bestehend aus dem Nierenkörperchen (Bowman-Kapsel mit dem Glomerulus) und den

Nierenkanälchen (Tubuli), die sich in einen proximalen, einen intermediären und einen distalen Abschnitt gliedern. Eine Niere umfasst etwa eine Million dieser Nephrone.

Wie in **Abbildung 4** dargestellt ist, besitzt ein Glomerulus mehrere Kapillarschlingen, die aus der *Arteriole afferens* hervorgehen und in die *Arteriole efferens* münden. Der Glomerulus ist aus drei Zelltypen aufgebaut: endotheliale Zellen, die auf der Innenseite der Kapillaren liegen, Podozyten auf der Außenseite der Kapillaren und mesangiale Zellen [57, 58]. Die Bowman-Kapsel besteht aus einem parietalen und einem viszeralem Blatt. Letzteres wird von den Podozyten gebildet. Zwischen beiden Blättern befindet sich ein spaltförmiger Kapselraum, der das aus den Kapillaren gepresste Glomerulusfiltrat enthält, welches in den proximalen Tubulus abfließt [58, 59].

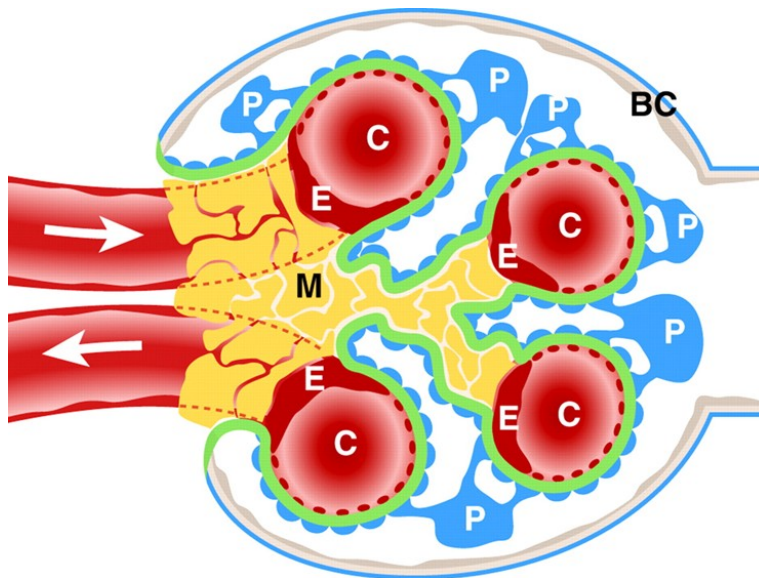


Abb. 4: Schematische Darstellung eines Glomerulus.

In der Graphik sind weniger Kapillaren abgebildet wie eigentlich pro Glomerulus vorhanden sind. Das Größenverhältnis der glomerulären Zellen zu dem Glomerulus ist nicht proportional. Dargestellt sind: grau = Bowman-Kapsel (parietales Blatt, BC); blau = Podozyten (P); hellrot = Kapillaren (C); rot = fenestriertes Endothelium (E); M = Mesangium (M); grün = glomeruläre Basalmembran. Die Öffnung rechts zeigt den Anfang eines proximalen Tubulus. Die Pfeile stellen den Blutfluss dar; [60].

Die hoch organisierte Struktur des Glomerulus (vorrangig das Mesangium und die Podozyten) stabilisiert die Kapillarschleifen [61]. Die primäre Filtration des Blutes findet über die glomeruläre Filtrationsbarriere (GFB) statt. Diese umfasst das fenestrierte Endothelium, die glomeruläre Basalmembran (GBM) und die Podozyten (**Abb. 5**) [57, 58]. Sie ist für Proteine (> 60.000 Dalton) nicht permeabel, lässt aber Wasser und kleine, gelöste Stoffe passieren. Die GFB funktioniert durch Größen- (Endothelium und Schlitzmembran) und Ladungsselektion (GBM und Schlitzmembran) [59, 62, 63].

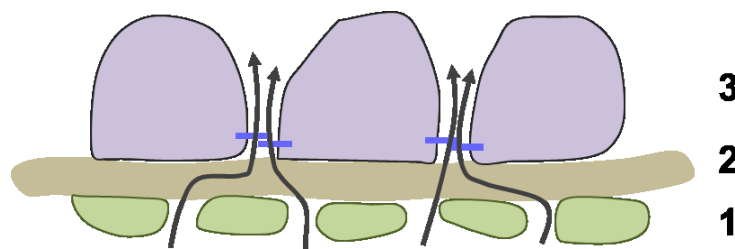


Abb. 5: Schematische Darstellung der glomerulären Filtrationsbarriere.

Dargestellt sind die drei Komponenten des glomerulären Filtrationsapparats: 1 = fenestriertes Endothelium, 2 = glomeruläre Basalmembran, 3 = Podozyten mit Schlitzmembran. Die Pfeile stellen den Filtrationsfluss über die glomeruläre Filtrationsbarriere dar; modifiziert nach [64].

1.2.2. Diabetische Nephropathie

Der *Diabetes mellitus* ist einer der häufigsten Stoffwechselerkrankungen der Welt mit etwa 366 Millionen Erkrankten weltweit im Jahr 2011. In Deutschland waren im Jahr 2007 mehr als 7 Millionen Menschen wegen Diabetes in Behandlung, was in etwa 9% der Bevölkerung entspricht [173].

Die Bezeichnung *Diabetes mellitus* („honigsüßer Durchfluss“) rührt von den hohen Glukosekonzentrationen im Urin her und einer damit einhergehenden osmotisch bedingten Polyurie. Man unterscheidet zwischen verschiedenen Formen: *Diabetes mellitus* Typ 1 (T1DM), Typ 2 (T2DM), einem Schwangerschaftsdiabetes und diversen anderen Typen. Der T2DM trägt auch den populären Namen

„Altersdiabetes“, wobei diese Bezeichnung heute nicht mehr korrekt ist, da durch veränderte Lebensweisen immer mehr junge Menschen und selbst schon Kinder erkranken. Gründe dafür liegen in der erheblichen Zunahme an übergewichtigen Personen durch den Konsum von sogenanntem „*Junk Food*“ und der mangelnden körperlichen Bewegung [173]. Im Kontext mit dem Anstieg der Lebenserwartung steigt die Zahl der T2DM-Erkrankungen jährlich kontinuierlich an und beläuft sich inzwischen in Deutschland auf etwa 90% aller Diabetesfälle [173]. Folgeerkrankungen des DM sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen (die häufigste Todesursache bei Diabetikern), die Diabetische Retinopathie, die Diabetische Neuropathie, Schlaganfälle und/oder die Diabetische Nephropathie [173].

Die Diabetische Nephropathie (DN), die Hauptfolgeerkrankung des *Diabetes mellitus*, ist die wesentlichste Ursache für die Ausbildung der terminalen Niereninsuffizienz in Deutschland und vielen anderen Ländern. Etwa 25% bis 40% aller Patienten mit T1DM und T2DM bekommen eine diabetische Nierenerkrankung [65]. Die frühe DN ist durch eine geringgradige Albuminausscheidung im Urin (die sogenannte Mikroalbuminurie) gekennzeichnet. Indikatoren der progressiven Erkrankung sind eine zunehmende Albuminurie (Makroalbuminurie), eine verminderte glomeruläre Filtrationsrate und ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen [58, 66, 67]. Pathologische Charakteristika der DN sind eine mesangiale Expansion, die Verdickung der GBM, eine glomeruläre Hypertrophie, der Verlust der Podozyten, eine Hyalinose der afferenten und efferenten Arteriolen, die Verdickung der tubulären Basalmembran, eine interstitielle Fibrose und eine tubuläre Atrophie. Der Verlust der glomerulären Struktur sowie interstitielle Veränderungen resultieren letztendlich in dem terminalen Nierenversagen [68, 69]. Die strukturellen Veränderungen werden durch die Interaktion von diversen, durch Hyperglykämie induzierten metabolischen und hämodynamischen Faktoren ausgelöst [65, 68]. Zu den hämodynamischen Faktoren zählen die Aktivierung verschiedener vasoaktiver Systeme wie des Renin-Angiotensin-Systems, sowie die Sekretion profibrotischer Zytokine, ein systemischer und intraglomerulärer Hypertonus. Metabolische Aspekte sind die Hyperglykämie, die Zunahme an AGEs, die Aktivierung der Proteinkinase C und ein veränderter Polyol-Metabolismus [65, 70]. Die Akkumulation von AGEs induziert progressive

Veränderungen der renalen Strukturen, da die AGE-Bildung an der extrazellulären Matrix eine gestörte Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion bedeutet. Zudem werden die AGE-modifizierten Matrixproteine schlechter durch Matrixmetalloproteasen abgebaut [65]. Durch Modifikationen der Basalmembran und der Glykokalyx verlieren diese Strukturen ihre negative Ladung und damit ihre Filtrationsselektivität [66, 71]. So modifizieren hohe AGE-Konzentrationen die Struktur von Endothelzellen und bedingen damit eine verminderte glomeruläre Filtrationsrate, was letztendlich eine weitere Akkumulation der AGEs fördert [2]. Weitere Elemente, die bei der DN von Bedeutung sind, sind die erhöhte Sekretion inflammatorischer Moleküle (Zytokine, Wachstumsfaktoren, Matrixmetalloproteasen), oxidativer Stress und die Aktivierung von RAGE [2, 65, 70].

Für die Analyse der DN *in vivo* existieren verschiedene diabetische Tiermodelle. Etablierte Diabetes-Mausmodelle sind einerseits die Behandlung mit Streptozotocin (STZ), charakteristisch für den T1DM, und andererseits *db/db*-Mäuse, die eine Mutation in dem Leptin-Rezeptor besitzen [72, 73]. Die *db/db*-Tiere zeigen bereits in einem Alter von wenigen Wochen einen adipösen Phänotyp. Des Weiteren zeichnen sie sich durch erhöhte Plasmainsulin- und Blutzuckerwerte, eine Insulinresistenz, exzessiven Durst und eine vermehrte Urinausscheidung aus. Die *db/db*-Tiere sind ein klassisches Tiermodell für den T2DM und entwickeln eine signifikante DN [72, 74].

1.3. Die Podozyten

1.3.1. Podozyten und ihre Funktion bei der glomerulären Filtration

Podozyten sind epitheliale Zellen mit einer einzigartigen zellulären Architektur [59, 75]. Ihr voluminöser Zellkörper, der die Organellen beherbergt, ragt in den Harnraum. Diesem Zellkörper entspringen die langen, primären Fortsätze, welche bis zu den glomerulären Kapillaren ragen. Diese werden von den sekundären Verzweigungen, den sogenannten Füßchenfortsätzen, umschlossen [57, 59]. Dabei sind die Füßchenfortsätze benachbarter Podozyten ineinander verflochten und bilden

dazwischen liegende Filtrationsschlitze, die von der Schlitzmembran überbrückt werden [59]. Die Schlitzmembran ist eine spezialisierte Adhäsionsverbindung zwischen den Podozyten. Sie bildet die Grenze zwischen der luminalen und der basalen Seite der Podozyten [59, 75]. Die luminale Seite und die Schlitzmembran sind von der Glykokalyx bedeckt, die reich an stark sialylierten Glykokonjugaten und sulfierten Molekülen wie Podocalyxin ist und den Podozyten eine negative Ladung verleiht [58, 59, 76, 77]. Mit der basalen Seite sind die Füßchenfortsätze der Podozyten über Integrin-Dimere und Dystroglykane durch die Bindung von Kollagen IV, Fibronectin und Laminin in der GBM verankert [59, 75, 78]. Die Podozyten sind an dem *Turnover* der GBM durch Sekretion von den meisten GBM-Bestandteilen und Matrix-modifizierenden Enzymen wie den Matrixmetalloproteasen (zum Beispiel MMP9) beteiligt [59, 66]. Für die strukturelle Integrität der Füßchenfortsätze sind die Kontakte zwischen benachbarten Podozyten und die Zell-Matrix-Interaktion wichtig. So sind die Füßchenfortsätze über ihr Zytoskelett mit der Schlitzmembran und der GBM verbunden. Die Zusammensetzung der GBM ist demzufolge auch für die Architektur der Podozyten von Bedeutung [59, 75].

Die Podozyten, inklusive der Filtrationsschlitze und der Schlitzmembran, haben eine große Bedeutung bei der glomerulären Filtration [59, 62]. Sie repräsentieren den hauptsächlichen Größenselektionsfilter der GFB. Die Filtrationsschlitze besitzen eine konstante Breite von 30 bis 40 nm [57-59, 79]. Dabei involvierte Moleküle sind Nephrin und P-Cadherin auf Seiten der Schlitzmembran sowie Zonula occludens-1 (ZO-1) und CD2-assoziiertes Protein (CD2AP) als Adaptormoleküle für das Aktinzytoskelett [57-59, 75]. Die einzigartige Form der Podozyten ist für die Ausübung ihrer Funktionen essentiell. Dabei ist das komplexe Zytoskelett der Zellen von Bedeutung, welches auch die Struktur der Füßchenfortsätze ermöglicht [59, 66]. In den Füßchenfortsätzen ist das dynamische Aktin-basierte Zytoskelett aus vorwiegend Aktin, α -Aktinin und Synaptopodin aufgebaut. Das umfangreiche Aktinzytoskelett ermöglicht den Podozyten den dynamischen Kontraktionen entgegen zu wirken, die durch den glomerulären, hydrostatischen Kapillardruck induziert werden, der in der Niere besonders hoch ist [57, 59].

Die Funktion der Podozyten liegt somit in der strukturellen Unterstützung der Kapillarschleifen gerade auch bei Blutdruckschwankungen, sie sind wichtig für die Aufrechterhaltung und Regulation der glomerulären Filtrationsbarriere, sind beteiligt an der Synthese und Reparatur der GBM, besitzen immunologische Funktionen und über ihre Signaltransduktion ermöglichen sie die Kommunikation zwischen den Zellen des Glomerulus [57, 58, 80, 81].

Vollständig entwickelte Podozyten sind terminal differenziert und nicht mehr fähig zu proliferieren. Sie verweilen in der G₀-Phase des Zellzyklus [59, 61]. Dieser Arrest wird durch die konstitutive Expression der Cyclin-abhängigen Kinase (CDK)-Inhibitoren (CKIs) aufrechterhalten (siehe **Abbildung 6**) [59, 82]. Die CKIs werden in zwei Gruppen unterteilt: die INK4 (*inhibitors of CDK4*)- und die CIP/KIP (CDK *interacting protein/kinase inhibitory protein*)-Familie. Der letzteren werden die Proteine p21^{Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2} zugeordnet, welche in den ruhenden Podozyten hochreguliert sind [59, 83, 84].

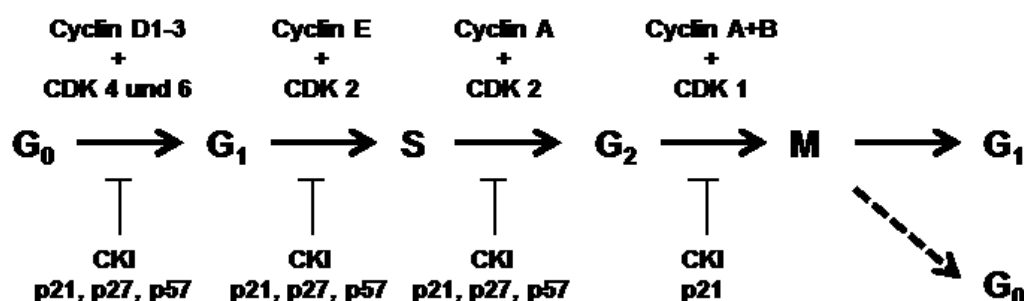


Abb. 6: Darstellung der einzelnen Phasen des Zellzyklus.

Gezeigt sind die jeweils integrierten Cycline und Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs), die für den Eintritt in die jeweils folgende Phase des Zellzyklus nötig sind. In dem unteren Teil sind die CDK-Inhibitoren (CKI) dargestellt, welche die Transition an den entsprechenden Kontrollpunkten unterbinden. G = *gap*, S = *synthesis*, M = *mitosis*, p21 = p21^{Cip1}, p27 = p27^{Kip1}, p57 = p57^{Kip2}; modifiziert nach [59].

Die Kultivierung primärer Podozyten *in vitro* stellt aufgrund der verminderten Proliferationsrate der Zellen ein Problem dar [85]. Untersuchungen von Mundel *et al.* [85] zeigten, dass einige Podozyten aus isolierten und kultivierten Glomeruli

auswachsen, indem sie wieder in den Zellzyklus einsteigen. Diese Zellen besaßen ein limitiertes Potential zu proliferieren und konnten vorübergehend *in vitro* kultiviert werden. Die Kultivierung induzierte aber eine Dedifferenzierung der Zellen, die von dem Verlust der Füßchenfortsätze und von spezifischen Markern differenzierter Podozyten wie beispielsweise Synaptopodin begleitet wurde [85]. Die Herstellung einer transgenen Maus mit einem unter der Kontrolle eines durch Interferon- γ induzierbaren H-2K^b-Promotors stehenden Temperatur-sensitiven „SV 40 (*simian virus*) large Antigen“ (tsA58Tag) [86] hat das Problem der *in vitro* Kultivierung gelöst. Mundel *et al.* [85] isolierten die Glomeruli aus den Nieren der Maus und kultivierten diese. Durch limitierte Verdünnung herauswachsender Zellen gewannen sie drei Maus-Podozytenklone (MPCs). Bei Kultivierung der MPCs unter permissiven Bedingungen (33°C und Zusatz von 100 U/ml Interferon- γ), die eine Proliferation der Zellen unterstützen, zeigten diese phänotypische Charakteristika undifferenzierter Podozyten. Unter nicht-permissiven Bedingungen (37°C und der Entzug von Interferon- γ) änderte sich die Morphologie der Zellen. Sie waren durch eine verminderte Proliferationsrate gekennzeichnet. Zellbiologische und elektro-physiologische Analysen belegten, dass die kultivierten, differenzierten MPCs vergleichbare Charakteristika besaßen wie die terminal differenzierten Zellen *in vivo* (wie die Expression von Synaptopodin) [85]. Die Generierung dieser transgenen Mauspodozyten ermöglicht die Analyse differenzierter Podozyten in der Zellkultur.

1.3.2. Podozytopathien

Als Podozytopathien werden Erkrankungen bezeichnet, die über eine Schädigung der Podozyten charakterisiert sind. Beispiele für podozytäre Erkrankungen sind die Verbreiterung der Füßchenfortsätze, eine zelluläre Hypertrophie, die Ablösung der Zellen von der GBM oder Apoptose [62, 87, 88]. Initiale Vorgänge sind dabei, unabhängig von der vorherrschenden Erkrankung, charakterisiert durch molekulare Veränderungen der Schlitzmembran, einer Reorganisation der Struktur der Füßchenfortsätze und einer Fusion der Filtrationsschlitze [75]. Die Ursachen sind vielfältig, die grundlegenden Mechanismen sind aber bis ins Detail noch nicht

bekannt [58, 59, 82]. Die Aktivierung von RAGE über AGE und die Produktion von ROS verursachen über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B pro-inflammatorische Prozesse [2, 46, 82]. Von Bedeutung ist zudem die Umgestaltung des Zytoskeletts sowie eine veränderte Expression der assoziierten Moleküle wie CD2AP, Nephrin, Podocin, was in Änderungen der Zell-Zell-Kontakte an der Schlitzmembran und der Zell-Matrix-Interaktion resultiert [57, 59, 75, 80].

Die initialen Prozesse verursachen morphologisch sichtbare Veränderungen der Podozyten wie die Verbreiterung und die Rückbildung der Füßchenfortsätze, die Bildung von Pseudozysten und eine Abflachung des Zellkörpers (**Abb. 7**) [57, 61, 62, 75, 80]. Die Verbreiterung der Füßchenfortsätze wird durch eine Unterbrechung in der Schlitzmembran, Abnormitäten in der GBM bzw. der Interaktion der Podozyten mit der GBM, Veränderung des Aktinzytoskeletts und/oder Modifikationen in der Zusammensetzung der luminalen Membran der Podozyten verursacht [75, 88]. Eine weitere Ursache für die Podozytopathien liegt in dem auf die Podozyten wirkendem, erhöhten mechanischen Stress aufgrund eines verstärkten Kapillardrucks und in Zusammenhang damit einer erhöhten Wandspannung [62, 80, 82, 89].

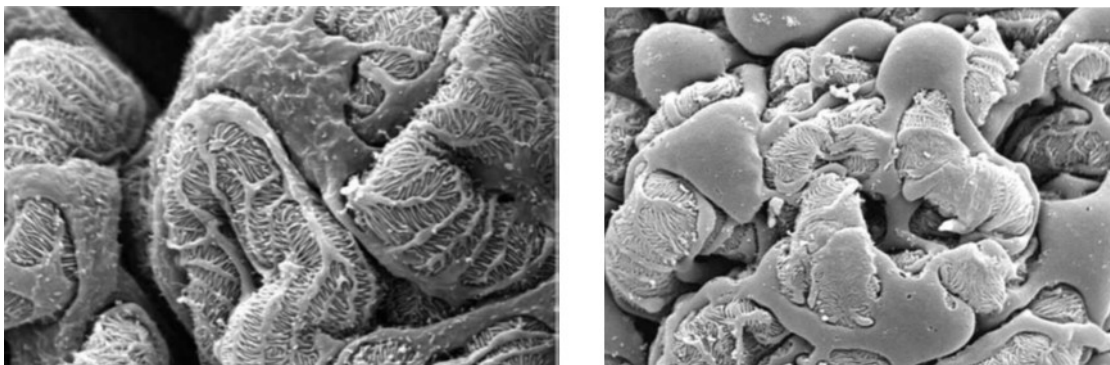


Abb. 7: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Podozyten eines gesunden (links) und eines geschädigten Glomerulus (rechts bei DN).

Die Abbildungen zeigen die Aufnahme eines glomerulären Tufts nach der Entfernung der Bowman-Kapsel, links von einem Kontrolltier und rechts von einem diabetischen Tier. In der linken Aufnahme ist der Zellkörper der Podozyten, die primären Fortsätze und die Füßchenfortsätze, die in der GBM verankert sind, deutlich zu erkennen. In der rechten Abbildung haben die Füßchenfortsätze eine geringere Dichte und die freigelegte GBM kommt zum Vorschein [66].

Die Schädigung der Podozyten verursacht letztendlich die Loslösung der Zellen von der GBM [61, 82]. Aufgrund der fehlenden Fähigkeit der Podozyten zu proliferieren, wird die GBM nicht neu „besiedelt“ und die freigelegten Bereiche können in Kontakt mit der Bowman-Kapsel treten und dort Synechien induzieren [57, 59, 62, 75, 80]. Die reduzierte Anzahl an Podozyten pro Glomerulus und die freigelegte GBM induzieren in den noch vorhandenen Podozyten kompensatorische Mechanismen wie die Verbreiterung der Füßchenfortsätze und eine Hypertrophie, die wiederum Änderungen in der Zusammensetzung des Zytoskeletts nach sich ziehen [82, 90]. Auf molekularer Ebene wird die Hypertrophie über den Wiedereintritt in die G₁-Phase des Zellzyklus durch die erhöhte Expression der CKIs wie p27^{Kip1} bedingt [59]. Die G₁/S-Transition wird aber durch die CKIs unterbunden [82, 84, 90, 91]. Die reduzierte Anzahl an Podozyten und die Verbreiterung der Füßchenfortsätze kann auch in humanen Studien mit T1DM- und T2DM-Erkrankten und bei dem experimentellen Diabetes belegt werden [62, 66, 82, 87, 92-99].

1.4. Der nukleare Inhibitor der Proteinphosphatase 1 (NIPP1)

1.4.1. NIPP1: Struktur und Funktionsweise

Beullens *et al.* [100] beschrieben 1992 erstmals zwei Moleküle mit ähnlichem Molekulargewicht, die im Nukleus boviner Thymuszellen als inhibitorische Untereinheit der Proteinphosphatase 1 (PP1) fungieren. Die als NIPP1a und NIPP1b (*nuclear inhibitor of PP1*) bezeichneten Proteine mit einem Molekulargewicht von 18 kDa bzw. 16 kDa zeigten eine asymmetrische Struktur und traten als Dimer auf [100]. Analysen von van Eynde *et al.* [101] belegten, dass diese beiden Polypeptide jedoch nur proteolytische Abbauprodukte des eigentlichen Proteins NIPP1 sind. Das zugehörige humane Gen *PPP1R8* (*protein phosphatase 1, regulatory subunit 8*) umfasst sieben Exons bei einer Größe von 25,2 kb. Von den vier gebildeten Transkripten ist NIPP1 α das Haupttranskript. Das entsprechende Translationsprodukt umfasst 351 Aminosäuren [101-103]. Die anderen drei Transkripte NIPP1 β , NIPP1 γ und NIPP1 δ entstehen durch die Nutzung einer

alternativen 5'-Splicestelle, Exon-Skipping und/oder alternative Polyadenylierung. Die Transkriptvarianten NIPP1 β und NIPP1 δ sind in diversen Zelltypen zu detektieren, aber Näheres ist nicht bekannt [101, 103]. NIPP1 γ hat Sequenz-homologie zu dem humanen ARD (*activator of RNA decay*)-1 (beide ohne das für NIPP1 typische RVxF-Motiv) und zeigt *in vitro* Endoribonuklease-Aktivität [103-105]. Die mRNS-Sequenzen von NIPP1 α und NIPP1 γ unterscheiden sich einzig an ihrem 3'-Ende des Exon 1 [103]. Im Weiteren wird das Haupttranskript NIPP1 α der Einfachheit halber als NIPP1 bezeichnet.

NIPP1 besitzt eine errechnete Größe von 38,5 kDa [101], die im Western Blot aber eher 42 kDa umfasst. Das Protein fungiert als inhibitorische Untereinheit der Proteinphosphatase 1 (PP1) mit einer K_i von 1-10 pM (*in vitro*), nicht aber der Proteinphosphatasen PP2A, PP2B und PP2C [100, 106]. NIPP1 bindet PP1 über drei Sequenzbereiche, von denen zwei im zentralen Drittel des Proteins lokalisiert sind und eine weitere am C-Terminus [101, 102, 107]. Im zentralen Drittel befindet sich ein typisches PP1-Bindemotiv: die RVxF (Arginin-Valin-x-Phenylalanin)-Sequenz (Nukleotide 200-203), welche aber an sich nicht inhibierend wirkt [102, 106]. Dieses kurze (4 bis 6 Aminosäuren), konservierte Bindemotiv ist aus meist basischen Aminosäuren zusammengesetzt. Weiter Sequenz-abwärts (Nukleotide 191-200) ist eine weitere, polybasische PP1-Bindestelle lokalisiert mit inhibierender Wirkung auf die Phosphatase [102, 107]. Die PP1-Bindung über das RVxF-Motiv wird durch die Phosphorylierung von NIPP1 durch die Proteinkinase A (PKA) und die Caseinkinase 2 (Ck2) kontrolliert [101, 106, 108, 109]. NIPP1 wird von den Kinasen an jeweils zwei Serin (Ser)- und Threonin (Thr)-Resten phosphoryliert. Das RVxF-Motiv wird von zwei Ser-Resten flankiert, die Angriffspunkte für jeweils eine der Kinasen darstellen (Ser 199 und Ser 204) [102, 106]. Die Phosphorylierung dieser Aminosäuren durch die Kinasen unterbricht die NIPP1-PP1-Bindung in diesem Bereich und damit die inhibierende Wirkung von NIPP1 auf die Phosphatase über die Sequenz weiter Nukleotid-abwärts [102, 108]. Die Phosphorylierung von NIPP1 impliziert aber keine komplette Loslösung von der Phosphatase [106]. Die beiden Kinasen wirken additiv, das bedeutet, dass nur die Phosphorylierung durch beide Kinasen NIPP1 in diesem

Bereich komplett inaktiviert [109]. Die inhibierende Wirkung von NIPP1 auf PP1 wird durch Dephosphorylierung von NIPP1 durch PP2A reaktiviert [108]. Die Mutation der beiden zentralen PP1-Bindesequenzen unterbindet die Fähigkeit von NIPP1, PP1 zu inhibieren, nicht vollkommen [107].

Die dritte PP1-Bindesequenz befindet sich am C-Terminus von NIPP1. Die C-terminal lokalisierte Sequenz umfasst die Aminosäuren 311 bis 351 mit einem Kern um die Aminosäuren 331 bis 337 [107]. Die inhibierende Wirkung des NIPP1 auf PP1 wird durch Phosphorylierung eines Tyrosinrests (Tyr 335) durch die Rezeptortyrosinkinase Lyn (ein Mitglied der Src-Familie) und durch RNS-Bindung unterbrochen [107]. NIPP1 bindet RNS vor allem an Adenin/Uracil-reichen Sequenzen, wobei die Interaktion mit der RNS und PP1 nicht exklusiv ist. Im Gegensatz zu diversen anderen RNS-bindenden Molekülen beherbergt NIPP1 kein typisches RNS-Bindemotiv, aber C-terminal eine hoch basische, Lysin-reiche Region, welche eine Bindung einzelsträngiger Nukleotidsequenzen über elektrostatische Interaktionen ermöglicht [104, 110]. Die Bindung von NIPP1 an PP1 erfolgt demzufolge über zwei Bereiche: einem im zentralen Drittel von NIPP1 und einem weiteren am C-Terminus gelegenem, welche kooperativ fungieren, aber unterschiedlich reguliert werden [107]. Einen schematischen Überblick der Organisation von NIPP1 gibt die **Abbildung 8**.

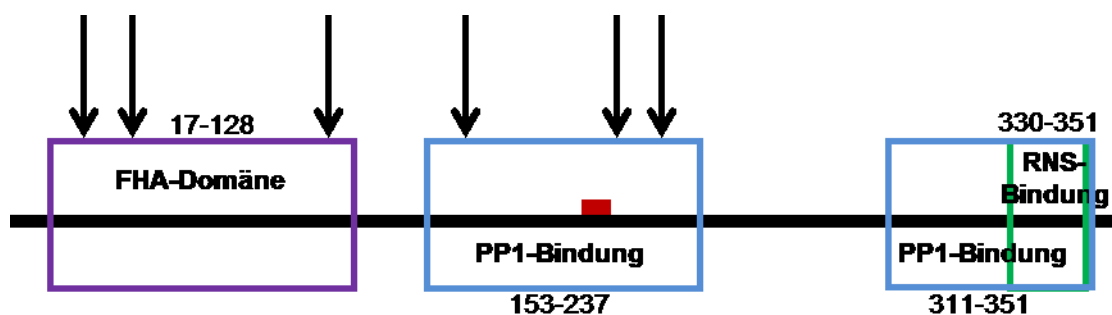


Abb. 8: NIPP1-Domänenstruktur.

Dargestellt sind die Lokalisation der einzelnen Domänen von NIPP1 innerhalb des Proteins und der entsprechende Sequenzbereich. Die RVxF-Sequenz ist rot hinterlegt. Die Pfeile stellen die Positionen der Introns dar; modifiziert nach [111]. FHA = *forkhead associated*.

Für den Transfer von NIPP1 in den Zellkern und das subnukleare *Targeting* des Moleküls zu den sogenannten „*nuclear speckles*“ ist die FHA (*forkhead associated*)-Domäne nötig [112]. Die FHA-Domäne ist ein *Signaling*-Modul, welches über den Kontakt mit phosphorylierten Ser- und Thr-Resten der Zielproteine agiert [113]. Das FHA-Modul von NIPP1 erkennt vorwiegend Sequenzen, die phospho-Thr-Reste in Thr-Pro (Prolin)-Dipeptid-reichen Regionen im Zielmolekül beherbergen [114]. Im Zellkern zeigt NIPP1 eine verstreute Lokalisation im Nukleoplasma [115]. Die Akkumulation von NIPP1 in den „*nuclear speckles*“ (subnuklearen Strukturen, die mit pre-mRNS Splicingfaktoren angereichert und in Interchromatinregionen des Nukleoplasmas lokalisiert sind [116, 117]) ist ein dynamischer Prozess, der unter anderem von der Interaktion mit weiteren NIPP1-bindenden Proteinen reguliert wird [112].

Die Deletion beider Allele für NIPP1 im Mausmodell ist embryonal lethal, wohingegen heterozygote Tiere eine normale Entwicklung zeigen. NIPP1-*Knockout* Mausembryos (NIPP1^{-/-}) sind durch eine verminderte Proliferationsrate und den Entfall der G₁/S-Transition gekennzeichnet [118]. Eine Überexpression von NIPP1 *in vitro* bewirkt hingegen eine erhöhte NIPP1-mRNS-Expression, aber keine Änderung auf Proteinebene. Wera *et al.* [119] zeigten, dass die NIPP1-Translation über die eigene mRNS, speziell einer Struktur am 5'-Ende der Nukleotidsequenz, inhibiert wird. Inwiefern NIPP1 seine eigene Translation unterbindet, ist nicht bekannt [119].

In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, dass NIPP1 nicht nur als nuklearer Inhibitor der Proteinphosphatase 1 fungiert, sondern auch in diverse andere Prozesse involviert ist, indem es eher als regulatorische Untereinheit von PP1 und als Gerüst-Protein im Zellkern wirkt [118]. So wurde für NIPP1 eine Interaktion mit diversen, in den Splicing-Prozess involvierten Molekülen wie CDC5L (*cell division cycle 5-like protein*), SAP155 (*Sit4 associated protein*) und MELK (*maternal embryonic leucin zipper kinase*) dokumentiert [120-125]. Des Weiteren konnte NIPP1 eine Funktion bei der Transkription nachgewiesen werden: erstens über die Regulation der RNAP II (DNS-abhängiger RNS-Polymerase II-Kernkomplex) durch seine Interaktion mit PP1 [126]; zweitens als transkriptioneller Repressor über eine

direkte Bindung der DNS, ähnlich seinem Interaktionspartner EED (*embryonic ectoderm development*) [127, 128]. In Verbindung damit ist NIPP1 in das über EZH2 (*enhancer of zeste homolog 2*)-vermittelte Gen-Silencing involviert [129, 130]. Teilweise werden auch PP1-unabhängige Funktionen von NIPP1 diskutiert, vor allem im Bereich des Spliceosom-Zusammenbaus [120].

1.4.2. Proteinphosphatase 1

In Eukaryoten ist die Phosphorylierung von Proteinen an vorzugsweise Serin/Threonin- bzw. Tyrosin-Resten einer der wichtigsten Regulationsmechanismen für die Kontrolle physiologischer Prozesse in der Zelle [131]. Die Phosphatasen werden, in Abhängigkeit von der Phosphorylierungsstelle des Substrats, in drei Gruppen unterteilt:

- Serin/Threonin-Phosphatasen,
- Tyrosin-Phosphatasen,
- dual-spezifische Phosphatasen.

Zu den Ser/Thr-Phosphatasen gehören die Genfamilien PPP (Phosphoprotein-Phosphatasen) und PPM (Mg^{2+} - und Mn^{2+} - abhängige Proteinphosphatasen) [132, 133]. Die Proteinphosphatase 1 (PP1) zählt zusammen mit PP2A und PP2B zur PPP-Familie [131, 134].

PP1 ist eine ubiquitär vorkommende Phosphatase mit einer vorwiegend nuklearen Lokalisation. Das Protein mit einem Molekulargewicht von 37 kDa setzt sich aus einer katalytischen und ein bis zwei regulatorischen Untereinheiten zusammen [135, 136]. Die katalytische Untereinheit existiert in vier Isoformen: α , β/δ , γ_1 und γ_2 , wobei die γ -Formen durch alternatives Splicing desselben Primärtranskripts entstehen. Die Isoformen besitzen eine Sequenzhomologie von etwa 90% auf Proteinebene, wobei die Unterschiede vor allem C- und N-terminal zu finden sind (**Abb. 9**).

Im Bereich des strukturellen Kerns und des katalytischen Zentrums weisen sie eine beinahe identische dreidimensionale Struktur auf und dieselben katalytischen Mechanismen [135, 137, 138].



Abb. 9: Proteinsequenz-Alignment der humanen PP1-Isoformen.

Abgebildet sind die Proteinsequenzen von PP1 α , PP1 β und PP1 γ . Die schwarzen Bereiche stellen Proteinabschnitte dar, die identisch zu der Konsensussequenz sind, die nicht markierten Regionen zeigen keine Übereinstimmung zu dieser; modifiziert nach [133]. Hs = *homo sapiens*.

Eine feste Zuordnung der Isoformen ist in der Literatur umstritten. Es ist eher wahrscheinlich, dass die Isoformen in den Zellen mobil sind und sich die Lokalisation in Abhängigkeit des Expressionsniveaus der interagierenden Untereinheiten ändert [139]. Das wird auch von dem Aspekt unterstrichen, dass die Isoenzyme eine teilweise überlappende Substratspezifität besitzen [140]. Die regulatorischen Untereinheiten werden in vier Gruppen unterteilt:

- Untereinheiten, welche die Aktivität von PP1 modulieren (z.B. I₁, CPI-17),
- Untereinheiten, welche die Translokation (MYPT1) und Substratspezifität (I₁/PHAP-I) beeinflussen,
- Gerüstproteine (AKAP),
- die Substrate von PP1 (Bad, pRb),

wobei die meisten mehr als eine Funktion ausüben [136]. Die Regulation der Phosphatase-Aktivität findet über die Änderung der Expression bzw. der

Konfiguration oder des Phosphorylierungsstatus der regulatorischen Untereinheiten statt [131, 136-138, 141]. Es sind etwa 100 Interaktionspartner von PP1 bekannt, von denen nur PNUTS und NIPP1 als regulatorische Untereinheit im Zellkern agieren [135, 142, 143]. Ein Großteil dieser bindet eine hydrophobe Furche von PP1 über das RVxF-Motiv. Die Bindung der Interaktionspartner über dieses Motiv induziert keine Konformationsänderungen in PP1 und besitzt auch keinen Einfluss auf dessen katalytische Aktivität. Diese initiale Interaktion ist eher die Grundlage für den Kontakt der regulatorischen Untereinheiten mit sekundären PP1-Sequenzmotiven, die zwar weniger affin sind, aber die Aktivität oder Substratspezifität der Phosphatase beeinflussen. Die Bindung der PP1-Interaktionspartner über das RVxF-Motiv wird vorwiegend über die Phosphorylierung von Aminosäure-Resten nahe dieser Region reguliert. Bei NIPP1 handelt es sich dabei um die beiden flankierenden Serin-Reste (196 RKN**SRVTF**S EDD 207 (*mus musculus*)) [136-138, 141, 142, 144]. Aufgrund der kurzen Sequenz des PP1-bindenden Motivs, welches von nicht konservierten Bereichen flankiert wird, besitzen die regulatorischen Untereinheiten kaum Sequenzhomologie und PP1 eine große Anzahl an Interaktionspartnern [135, 141]. Durch die enorme Vielfalt der regulatorischen Untereinheiten und die große Substratspezifität ist die Phosphatase in diverse zelluläre Reaktionen involviert. PP1 ist ein multifunktionelles Enzym, welches unter anderem bei der Regulation des Zellzyklus, dem pre-mRNS-Splicing, der Transkription, der Translation, der Muskelkontraktion, dem Kohlenhydrat-Metabolismus, der Apoptose, des neuronalen *Signalings*, der Meiose und der Zellteilung beteiligt ist [134, 135, 141, 143, 145-149]. PP1 greift an mehreren Punkten in das Zellzyklusgeschehen ein. Die Phosphatase kontrolliert diverse Moleküle während der M-Phase und induziert so einen mitotischen Arrest oder eine fehlerhafte Zytokinese. Für PP1 konnte gezeigt werden, dass es der Gegenspieler der Proteinkinasen der Aurora-Familie ist, welche an der Regulation der Meiose und Mitose beteiligt sind. Des Weiteren reguliert PP1 die G₁/S-Transition über Dephosphorylierung des pRb-Proteins in der G₁-Phase des Zellzyklus und in diesem Zusammenhang den pRb-vermittelten Zellzyklusarrest [141].

1.5. Zielsetzung der Arbeit

- Ein Ziel der Arbeit war zu untersuchen, welchen Einfluss die Behandlung der Podozyten mit AGE-BSA auf die Expression von NIPP1, sowohl auf mRNS- als auch auf Proteinebene, ausübt.
- Da für NIPP1 belegt ist, dass das Molekül als inhibierende Untereinheit der Proteinphosphatase 1 agiert, sollte in einem nächsten Schritt die Expression von PP1 in den Podozyten unter AGE-BSA untersucht werden. Zudem wurde die Aktivität der Phosphatase in einem Ser/Thr-spezifischen Phosphatase Assay bei Suppression von NIPP1 gemessen.
- Es war zu klären, ob die durch AGE-BSA induzierte, verminderte NIPP1-Expression über RAGE vermittelt wird.
- Pathophysiologische Charakteristika der Podozyten bei der Diabetischen Nephropathie sind eine Hypertrophie der Zellen in Verbindung mit einem Arrest in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus. Deshalb sollte über die Transfektion der Podozyten mit siRNS die NIPP1-Expression für die Analyse der Proliferationsrate der Zellen und deren Zellzyklusverhalten sowie einer möglichen Hypertrophie supprimiert werden.
- Da für die Podozyten die Expression von RAGE nachgewiesen ist, welcher bei Exposition von AGE hochreguliert ist, sollte untersucht werden, wie die NIPP1-Suppression die Aktivierung der Zelle über RAGE beeinflusst. Dazu wurde der RAGE-Signaltransduktionsweg bzw. die NFκB-Aktivität analysiert.
- Um die Relevanz der *in vitro* Daten einschätzen zu können, sollte die NIPP1-Expression in den Podozyten von *db/db*-Mäusen, einem Modell für den Typ 2 *Diabetes Mellitus*, analysiert werden.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

Die für die Analysen benötigten Reagenzien, Materialien, sowie die verwendeten Geräte mit der entsprechenden Software sind in den **Tabellen 1 bis 6** aufgelistet. Die üblichen Reagenzien, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte sind nicht vermerkt.

Tab. 1: Für die Zellkultur genutzte Reagenzien.

Bezeichnung	Hersteller
Accutase	PAA, Cölbe, Deutschland
Fötale Kälberserum, steril filtriert	Lonza, Köln, Deutschland
Interferon- γ	Invigate, Jena, Deutschland
MycoAlert® Mykoplasma Detection Kit	Lonza, Köln, Deutschland
Penicillin-Streptomycin (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Gallen, Schweiz
RPMI Medium 1640+GlutaMAX™	Gibco, Darmstadt, Deutschland

Tab. 2: Substanzen für molekularbiologische Arbeiten.

Bezeichnung	Hersteller
Annexin-V-FLUOS Staining Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche, Mannheim, Deutschland
Cell Titer 96® AQueous One Solution Cell	Promega, Mannheim, Deutschland
GoTaq® Green Master Mix	Promega, Mannheim, Deutschland
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, POD	Roche, Mannheim, Deutschland
LDH-Cytotoxicity Assay Kit	BioVision, Milpitas, CA, USA
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche, Mannheim, Deutschland
Luciferase 1000 Assay system	Promega, Mannheim, Deutschland
Luciferase cell culture lysis 5x reagent	Promega, Mannheim, Deutschland
NEON™ 100µl Kit	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
NucleoSpin® Tissue	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
ProFluor® Ser/Thr PPase Assay	Promega, Mannheim, Deutschland
Reverse Transcription System	Promega, Mannheim, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

Tab. 3: Allgemeine Chemikalien und Reagenzien.

Bezeichnung	Hersteller
100 bp DNS-Leiter, äquimolar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid/Bis-Lösung (37,5:1), 30% (w/v)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Albumin Fraktion V >98%, pulv., bovine	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Albumin, Bovine Serum, Fraction V, Fatty Acid-Poor, Endotoxin-Free	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat, analytical grade	Serva, Heidelberg, Deutschland
Aprotinin from bovine lung	Serva, Heidelberg, Deutschland
Avidin/Biotin Blocking Kit	Linaris, Dossenheim, Deutschland
Bradford Reagenz	Sigma-Aldrich, St. Gallen, Schweiz
Cantharidinsäure	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
complete Lysis-M	Roche, Mannheim, Deutschland
complete, Mini, EDTA-free	Roche, Mannheim, Deutschland
DAB Substrate Kit for Peroxidase	Linaris, Dossenheim, Deutschland
4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, St. Gallen, Schweiz
DNase I, recombinant, grade I	Roche, Mannheim, Deutschland
Ethidium Bromide Solution (10 mg/ml)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Fenvalerat	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd-Lösung 5%	Fischar, Saarbrücken, Deutschland
Formaldehyd 37%, p.a., ACS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Histosec® Pastillen	Merck, Darmstadt, Deutschland
ImmPact™ AEC Peroxidase Substrat Kit	Vector Laboratories, Peterborough, UK
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kontroll-Ziege-IgG	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
nicht-immunogenes Ziege-Serum	Vector Laboratories, Peterborough, UK
Kontroll-Kaninchen-IgG	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Kontroll-Maus-IgG	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
pNFκB-Luc	Clontech Laboratories, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
Precision Plus Protein™ Standards; dual color	Bio-Rad, München, Deutschland
Propidiumjodid, minimum 95%	Sigma-Aldrich, St. Gallen, Schweiz
Protein Phosphatase Inhibitor-2	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Rnase Dnase free from bovine pancreas	Roche, Mannheim, Deutschland
Roti®-Free Stripping Puffer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rsa I	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Staurosporine from <i>Streptomyces sp.</i>	Sigma-Aldrich, St. Gallen, Schweiz
Triton X-100, reinst	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween® 20, reinst	Serva, Heidelberg, Deutschland
UltraPure 10X TBE Puffer	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Vectastain ABC Kit (Kaninchen-IgG)	Linaris, Dossenheim, Deutschland
Western Lightning™ Plus-ECL	Roche, Mannheim, Deutschland

Tab. 4: Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
CapStrips	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Criterion™ Cassettes (12+2 Well, 1.0mm)	Bio-Rad, München, Deutschland
Dako Pen	Dako, Glostrup, Denmark
Extra Thick Blotting Paper (13x8 cm)	Bio-Rad, München, Deutschland
Lab-Tek chamber slides, permanox sterile (4-Well)	Nunc, Langenselbold, Deutschland
PVDF Transfer Membrane	Millipore, Billerica, MA, USA
QIAshredder	Qiagen, Hilden, Deutschland
TwinTec PCR plate 96	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Whatman-3mm-Papier	GE Healthcare, Solingen, Deutschland

Tab. 5: Auflistung der Geräte.

Bezeichnung	Hersteller
AlphaTRAK Blood Glucose Monitoring System	Abbott, Illinois, USA
CASY® Cell Counter DT	Innovatis, Mannheim, Deutschland
Criterion™ Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
BD FACSCalibur™	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axioplan	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Histokinette TP 1020	Leica, Wetzlar, Deutschland
Intas UV-System	Intas, Göttingen, Deutschland
Paraffingießstation EG 1160	Leica, Wetzlar, Deutschland
LAS-3000 (Luminescent Image Analysis System)	Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland
Laserscanningmikroskop (LSM) 510 META	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Lyovac GT2	AMSCO Finn-Aqua, Hürth, Deutschland
Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Mastercycler realplex ⁴ egradient S	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
NEON™ Transfection System	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Pellicon Labscale™ TFF System	Millipore, Billerica, MA, USA
Rotationsmikrotom RM 2165	Leica, Wetzlar, Deutschland
Sicherheitswerkbank LaminarAir 1.2 Holten	IBS Integra Bioscience, Fernwald, Deutschland
infinite Reader M200	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen, Deutschland
Trans-Blot® SD Cell	Bio-Rad, München, Deutschland

Tab. 6: Verwendete Computerprogramme.

Software	Hersteller
AxioVision Rel. 4.6.	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
CellQuest™ Pro	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
i-control Software	Tecan, Crailsheim, Deutschland
LAS-3000 ImageReader	Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland
AIM 4.2	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Multi-Gauge	Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland
Realplex	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
SPSS für Windows Version 11.0	SPSS Inc., Ehningen, Deutschland
Intas	Intas, Göttingen, Deutschland
WinMDI 2.9	Purdue University Cytometry Laboratories, West Lafayette, IN, USA

2.1.1. Oligonukleotide und Real-Time PCR-Programme

Die murinen Gensequenzen wurden der Internetdatenbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore> entnommen und auf deren Grundlage die Primer entworfen. Die entsprechenden Sequenzen sind in **Tabelle 7** dargestellt.

Tab. 7: Sequenzen der verwendeten murinen Primerpaare.

Primer	Sequenz (5' -> 3')	Hersteller
NIPP1 forward	CCACAAACACCTGAAGAGA	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
NIPP1 reverse	TGGTCTCTGGATGTCCAGG	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
PP1 forward	AACGTGCAGCTGACAGAGAA	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
PP1 reverse	GGTCTCCAAAGACTGCTTGC	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
GAPDH forward	TGTCAGCAATGCATCCTGCA	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
GAPDH reverse	GATGTCATCATACTTGGCAG GTT	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
TNF α forward	GGCAGGTCTACTTTGGAGTC ATTGC	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
TNF α reverse	ACATTCGAGGCTCCAGTGAA TTCGG	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
oIMR0985dbdb	AGAACGGACACTCTTTGAAGT CTC	TIB MolBiol, Berlin, Deutschland
oIMR0986	CATTCAAACCATAGTTTAGGT TTGTGT	TIB MolBiol, Berlin, Deutschland

Tab. 8: Überblick über die eingesetzte siRNS.

siRNS	Sequenz (5' → 3')	Hersteller
NM_146154_stealth_NIPP1	GACAAGCUAAUUGAGAAGCU GAUUA	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
	UAAUCAGCUUCUCAUUAGC UUGUC	
Kontroll siRNS	AllStars Neg. control siRNS	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.2. Primäre und sekundäre Antikörper

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper mit der jeweils eingesetzten Verdünnung sind in den **Tabellen 9** und **10** aufgeführt.

Tab. 9: Primäre Antikörper.

Antikörper	produziert in	Hersteller	Verdünnung
β-Aktin, clone AC-15	Maus	Sigma-Aldrich, St. Gallen, Schweiz	WB: 1:2000
NIPP1 (G-19)	Ziege	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland	WB: 1:1000
p27 ^{Kip1}	Kaninchen	Cell Signaling, Boston, MA, USA	WB: 1:1000
PP1 (FL-18)	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland	WB: 1:1000
PPP1R8	Kaninchen	Aviva Systems Biology, San Diego, CA, USA	WB: 1:1000
RAGE (N-16)	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland	ICC/IF: 1:100
Synaptopodin (SE-19)	Kaninchen	Sigma-Aldrich, St. Gallen, Schweiz	ICC: 1:100
Vinculin, clone hVIN-1	Maus	Sigma-Aldrich, St. Gallen, Schweiz	WB: 1:2000

Tab. 10: Sekundäre Antikörper.

Antikörper	produziert in	Hersteller	Verdünnung
Affinity Purified Antibody To rabbit-IgG (H+L)	Ziege	KPL, Gaithersburg, Maryland, USA	WB: 1:2000
Affinity Purified Antibody To mouse-IgG (H+L)	Ziege	KPL, Gaithersburg, Maryland, USA	WB: 1:2000
Affinity Purified Antibody To goat-IgG (H+L)	Kaninchen	KPL, Gaithersburg, Maryland, USA	WB: 1:2000
Cy®3 anti-rabbit-IgG (H+L)	Ziege	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland	IF: 1:500
Alexa Fluor®568 anti- goat IgG (H+L)	Esel	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland	IF: 1:500
Alexa Fluor®488 anti- rabbit IgG (H+L)	Esel	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland	IF: 1:500

2.2. Methoden

2.2.1. Kultivierung der murinen Podozyten

Die Kultivierung der murinen Podozyten erfolgte im Brutschrank (Heracell 150 i CO₂ Inkubator, Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland) bei einem CO₂-Gehalt von 5% und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%.

Podozyten sind *in vivo* terminal differenzierte, glomeruläre, viszerale Epithelzellen. Deshalb wurde für die *in vitro* Analysen ausschließlich die transgene, murine Podozytenzelllinie von Mundel *et al.* [85] verwendet. Wie bereits unter 1.3.1. beschrieben, ermöglicht das in das Genom inserierte, thermosensible „SV 40 large Antigen“ den Wechsel zwischen einem undifferenzierten und einem differenzierten Zustand. Die Kultivierung bei 33°C und der Zusatz von 10 U/ml Interferon- γ (permissive Bedingungen) bedingt die Expression des „SV 40 large Antigens“ und ermöglicht die Proliferation der Podozyten *in vitro*. Die Podozyten wurden in dem Zellkulturmedium RPMI 1640, versetzt mit 10% Hitze-inaktiviertem FKS und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, kultiviert. Für das Passagieren wurden die Zellen kurz bei 33°C und 5% CO₂ mit Accutase inkubiert und die Suspension im Anschluss in Zellkulturmedium aufgenommen und bei 250 rcf zentrifugiert. Ein Teil des resuspendierten Zellpellets wurde für die weitere Kultivierung der Podozyten verwendet.

Die Umstellung auf nicht-permissive Konditionen (37°C, Entzug von Interferon- γ) inaktiviert das „SV 40 large Antigen“ und bedingt in Folge dessen die für die Analysen nötige Ausdifferenzierung der Zellen. Der immuncytochemische Nachweis einer Expression von Synaptopodin (**Abb.10**) diente als Beleg für die erfolgreiche Differenzierung der Zellen.

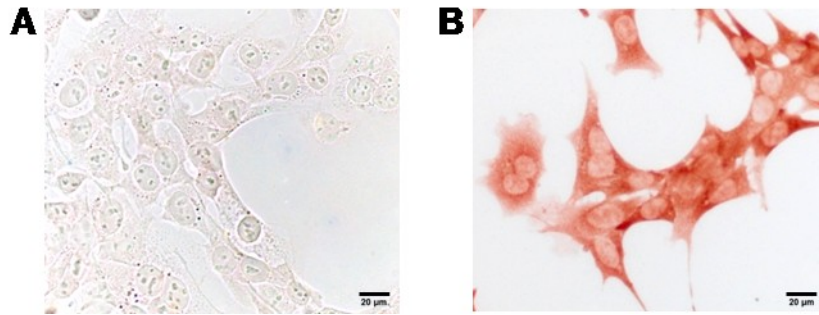


Abb. 10: Immuncytochemischer Nachweis von Synaptopodin.

(A) ICC undifferenzierter Podozyten. Es ist keine Färbung von Synaptopodin erkennbar; (Vergrößerung 400x). (B) Immuncytochemischer Nachweis von Synaptopodin in differenzierten Podozyten; (Vergrößerung: 400x).

Für die *in vitro* Versuche wurden die differenzierten Podozyten in den Passagen 10 bis 18 verwendet. Alle Versuche wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt. Die eingesetzten Zellzahlen für die jeweiligen Zellkulturformate waren:

4-Well-chamber slides (permanox)	$1 \cdot 10^4$ Zellen
96-Well-Mikrotiterplatte	$5 \cdot 10^3$ Zellen
12-Well-Zellkulturplatte	$1 \cdot 10^5$ Zellen
6-Well-Zellkulturplatte	$4 \cdot 10^5$ Zellen

Die kultivierten Podozyten wurden in regelmäßigen Abständen auf das Vorhandensein von Mykoplasmen mit dem MycoAlert® Mykoplasma Detection Kit getestet.

2.2.2. Herstellung von AGE-BSA

Für die Präparation von nicht glykiertem Kontroll-BSA (Co-BSA) und glykiertem BSA (AGE-BSA) wurde eine 5%-ige BSA-Lösung ohne bzw. mit Zugabe von 500 mM D(+)-Glukose hergestellt und ein pH-Wert von 7,4 eingestellt. Danach wurde beiden BSA-Lösungen 4 mM $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ beigefügt und die steril filtrierten Lösungen 60 Tage bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Das Kupfersulfat wurde als Katalysator

zugesezt um die Degradation von Glukose (Autooxidation) zu erreichen. Die Ansätze wurden anschließend gegen das etwa 30-fache Volumen einer 500 mM NH_4HCO_3 -Lösung dialysiert um überschüssige Glukose zu entfernen und danach lyophilisiert. Die darauf folgende Konzentrationsbestimmung des Pentosidin im HPLC Assay und von CML mit einem ELISA diente der Charakterisierung der entstandenen AGE-modifizierten Proteine [150]. Der Pentosidin- und CML-Gehalt der in dieser Arbeit verwendeten Substanzen war:

Tab. 11: CML- und Pentosidin-Konzentration von Co-BSA und AGE-BSA.

	CML (pM/mg)	Pentosidin (pM/mg)
Co-BSA	125	3
AGE-BSA	9324	23

Für die *in vitro* Versuche wurden die Podozyten über Nacht in Zellkulturmedium ohne Serum inkubiert und anschließend mit 5 mg/ml Co-BSA bzw. 5 mg/ml AGE-BSA (in 0,1% FKS RPMI 1640-Medium) für 24 h behandelt. Die genannten Bedingungen für die Behandlung der Podozyten mit AGE-BSA sind in zahlreichen Vorversuchen ermittelt worden und sind in der Arbeitsgruppe etabliert. Da diese Konzentration an AGE-BSA häufig auch für Untersuchungen an weiteren Zelllinien verwendet wird, besteht als Nebeneffekt eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse.

2.2.3. Transfektion mit NIPP1 siRNS

Die Transfektion der Podozyten mit NIPP1 *small interfering* RNS (siRNS) diente dazu, die Rolle von NIPP1 in den Podozyten indirekt zu erfassen. In diesem auch als *gen silencing* bezeichnetem Prozess unterbindet die interferierende RNS die Transkription der entsprechenden mRNA und ermöglicht so die Funktionsanalyse des ausgeschalteten Proteins. Zwei gängige Methoden der siRNS Transfektion sind das Einschleusen durch Lipofektamin und die Elektroporation der Zellen. Im Gegensatz zu der Elektroporation zeigte die Transfektion der Podozyten mit NIPP1 siRNS mithilfe von Lipofektamin keine Wirkung auf die NIPP1-Genexpression. Für

die Analysen wurde deshalb die Methode der Elektroporation für die Transfektion der Zellen genutzt unter Verwendung des NEONTM-Transfektionssystems.

Für die Transfektion wurden die Podozyten mit Accutase von der Zellkulturflasche abgelöst, zentrifugiert und in 10% FKS-haltigem RPMI 1640-Medium (ohne Antibiotika) resuspendiert. In Abhängigkeit des durchgeführten Assay wurde die entsprechende Anzahl an Zellen erneut zentrifugiert, in 100 µl Puffer R resuspendiert und mit 10 nM NIPP1 siRNS-Duplexen bzw. 10 nM Kontroll-siRNS-Duplexen (co siRNS) versetzt. Für die Elektroporation der Zellen unter Verwendung des Programms 3 des NEONTM-Transfektionssystems (20 ms, 1500 V, 1 Puls) wurde die Suspension mit der NEONTM-Pipette aufgenommen und im Anschluss in 10% FKS-haltigem RPMI 1640-Medium ohne den Zusatz von Antibiotika für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert.

2.2.4. Analyse der Laktat-Dehydrogenase-Aktivität

Um zu gewährleisten, dass die Behandlung der Podozyten mit AGE-BSA bzw. die siRNS Transfektion auf die Zellen nicht zytotoxisch wirkt, wurde die Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Aktivität im Zellkulturmedium bestimmt. Für die Analysen wurden entsprechend behandelte Podozyten in 96-Well-Zellkulturplatten kultiviert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die für 24 h in 0,1%-igem RPMI 1640-Medium bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert wurden. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen für 4 h mit 1% Triton X-100 (in 10% FKS-haltigem RPMI 1640-Medium) inkubiert. Für die Analyse der LDH-Konzentration im Zellkulturüberstand wurde die 96-Well-Mikrotiterplatte zentrifugiert, der Überstand in ein neues Well pipettiert und pro Well 100 µl der Reaktionsmischung zugefügt. Als *background*-Kontrolle diente das verwendete Zellkulturmedium. Nach einer Inkubation für 30 min im Dunkeln bei RT wurde die Absorption der Proben mit dem Tecan infinite Reader M200 bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen.

Die Zytotoxizität der Behandlung in Prozent wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = \frac{\text{zu testende Probe} - \text{Negativkontrolle}}{\text{Positivkontrolle} - \text{Negativkontrolle}} \times 100$$

2.2.5. RNS-Isolierung und reverse Transkription

Die Isolierung der RNS mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Gewinnung der RNS wurden die Podozyten in 12-Well-Zellkulturplatten kultiviert und entsprechend behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit und dem Waschen des Zellrasens mit PBS zur Entfernung von Rückständen des Zellkulturmediums wurden 500 µl RLT-Lysispuffer + 5 µl 2-Mercaptoethanol zugegeben. Der RLT-Puffer enthält Guanidiniumthiocyanat, welches die Zellen lysiert und Enzyme wie RNasen inaktiviert. Durch Zugabe von 70%-igem Ethanol wurde die RNS aus der wässrigen Lösung präzipitiert und bei der anschließenden Zentrifugation der Lösung über die RNeasy mini columns an die Siliciagelmembran der Säulen adsorbiert. Kontaminationen wurden durch mehrmaliges Waschen der Membran mit dem in den Kit enthaltenen Puffern eliminiert. Die RNS wurde über die Zugabe von RNase-freiem Wasser eluiert und die Konzentration und die Reinheit durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem Tecan infinite Reader M200 ermittelt. Die OD (optische Dichte) von 1 bedeutete einen RNS-Gehalt von 40 µg/ml. Um den Grad der Verunreinigung der Proben mit zum Beispiel Proteinen zu bestimmen, wurde der Quotient A260/A280 ermittelt.

Für die Analyse der Genexpression mit der Real-Time PCR wurde 1 µg RNS in cDNS (komplementäre DNS) unter Verwendung des Reverse Transcription System von Promega in einem Volumen von 20 µl umgeschrieben.

Der Reaktionsmix für den Umsatz von 1 µg RNS setzte sich zusammen aus:

4 µl MgCl ₂ (25 mM)	<u>Programm:</u>	
2 µl Reverse Transkriptions-Puffer (10x)	42°C	60 min
2 µl dNTP Mixtur (10 mM)	95°C	5 min
0,5 µl RNasin® Ribonuklease Inhibitor		
0,75 µl AMV Reverse Transkriptase (20 U/µl)		
1 µl Oligo (dT) ₁₅ Primer.		

2.2.6. Real-Time PCR (RT PCR)

Bei der PCR werden bestimmte Sequenzen einer cDNS, definiert über die Wahl der verwendeten Primer, amplifiziert. Die verwendeten Primer mit ihrer Sequenz sind in der **Tabelle 7** aufgeführt. Die Größe der PCR-Produkte für die jeweiligen Primerpaare beträgt für NIPP1: 349 bp, für PP1: 231 bp, für GAPDH: 336 bp und für TNF α : 300 bp.

Die Real-Time PCR (RT PCR) verfolgt das Ziel die Expression der mRNA (in Form von cDNS) über den Einsatz DNS-bindender Fluoreszenzfarbstoffe quantifizieren zu können. Dabei ist das detektierte Fluoreszenzsignal proportional zu der Konzentration spezifischer cDNS-Amplifikate. Der PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz einen gewissen Schwellenwert erreicht, wird als C_T-Wert (*cycle threshold*) definiert. Das als Referenz verwendete *Housekeeping*-Gen war GAPDH. Für die RT PCR wurde der LightCycler® 480 SYBR Green I Master Kit unter Verwendung des Realplex Mastercycler von Eppendorf eingesetzt. Der RT PCR-Reaktionsmix setzte sich aus jeweils 1 µl Forward- und Reverse-Primer (Endkonzentration von 0,5 µM) für das Gen von Interesse bzw. für GAPDH, 10 µl DNS-spezifischen SYBR Green I Dye und 1 µl cDNS zusammen.

Für die Amplifikation der Gentranskripte wurde folgendes RT PCR-Programm verwendet:

1	initiale Denaturierung	10 min	95°C
Amplifikation:			
2	Denaturierung	15 s	95°C
3	Primer-Annealing	30 s	58°C
4	Elongation	20 s	72°C
Schritt 2 bis 4 in 35 Zyklen			
Schmelzkurve:			
5	Denaturierung	15 s	95°C
6	Annealing	15 s	58°C
7	Denaturierung	15 s	95°C
8	Kühlung	∞	4°C.

Für die relative Quantifizierung der transkribierten RNS wurde die $\Delta\Delta C_T$ -Methode nach Livak und Schmittgen [151] angewandt. Dazu wurden die erhaltenen C_T -Werte gegen die C_T -Werte für GAPDH normalisiert und aus den errechneten ΔC_T der Mittelwert für jede Behandlung ermittelt. Die Änderung in der Genexpression relativ zur Kontrollbehandlung wurde mit der Formel $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ berechnet, wobei $\Delta\Delta C_T$ die Differenz aus ΔC_T -Behandlung und ΔC_T -Kontrolle ist.

2.2.7. Proteinisolierung

Für die Gewinnung von Protein wurden die Podozyten in 6-Well-Zellkulturplatten kultiviert. Nach dem Spülen mit PBS wurden die Zellen mit Lysepuffer versetzt und mit einem Zellschaber vom Untergrund gelöst. Nach Inkubation der Suspension für 20 min auf Eis wurden die Lysate für 15 min bei 10.000 rcf zentrifugiert und der Überstand für weitere Analysen verwendet.

Lysepuffer für Proteine: (complete Lysis-M)

complete Mini EDTA-freie Tabletten, 10 µg/ml Aprotinin, 1 mM PMSF, 2 mM Na₃VO₄

Um die Proteinkonzentration zu bestimmen, wurde die Bradford-Methode gewählt [152]. Für die Quantifizierung der gemessenen Werte wurde eine BSA-Eichkurve konstruiert mit Konzentrationen zwischen 0,1 mg/ml und 2,0 mg/ml BSA. Die Absorptionsmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm mit dem Tecan infinite Reader M200.

2.2.8. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE), Western Blot und Immundetektion

In der SDS-PAGE werden die Proteine elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Zusammensetzung der dafür verwendeten SDS-Polyacrylamidgele ist der **Tabelle 12** zu entnehmen. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels ist abhängig von der molekularen Größe des zu detektierenden Proteins. Für Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 30-60 kDa wurden 12%-ige und für Proteine kleiner als 30 kDa 15%-ige Trenngele verwendet.

Tab. 12: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE.

Trenngel 15%	Trenngel 12%	Sammelgel 5%
6,9 ml destilliertes Wasser	9,9 ml destilliertes Wasser	3,4 ml destilliertes Wasser
15 ml 30% Acrylamid	12 ml 30% Acrylamid	0,66 ml 30% Acrylamid
7,5 ml Tris pH 8,8 (1,5 M)	7,5 ml Tris pH 8,8 (1,5 M)	1,25 ml Tris pH 6,8 (1 M)
0,3 ml 10% SDS	0,3 ml 10% SDS	0,025 ml 10% SDS
0,3 ml 10% APS	0,3 ml 10% APS	0,2 ml 10% APS
0,03 ml TEMED	0,03 ml TEMED	0,03 ml TEMED

Bevor die Lysate in Aliquots von 30 µg in die Taschen des Sammelgels aufgetragen werden konnten, wurden diese mit SDS-Ladepuffer nach Laemmli [153] versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V.

Der Western Blot diente dazu, die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran zu übertragen. Die hydrophobe Membran wurde dafür kurz in Methanol geschwenkt. Der Semi-Dry Blot wurde nach dem Zwei-Puffer-System bei einer konstanten Spannung von 15 V für 1 h durchgeführt. Um eine unspezifische Antikörper-Bindung zu verhindern, wurde die Membran für 1 h mit 3% BSA/PBS bei RT inkubiert. Danach wurde sie über Nacht mit dem primären Antikörper bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/0,05% Tween20 inkubierte die Membran für 1 h mit dem entsprechenden, sekundären HRP (*horse radish peroxidase*)-gekoppelten Antikörper. Nach erneutem Waschen wurde die Membran mit der ECL (*enhanced chemoluminescence*)-Lösung benetzt und die Chemolumineszenz mit dem LAS-3000 und der LAS-3000 ImageReader Software detektiert. Die Expositionszeit variierte je nach der Stärke des Lichtsignals. Die eingesetzten Antikörper mit den entsprechenden Verdünnungen sind in den **Tabellen 9** und **10** aufgelistet. Die Rezepte der bei SDS-PAGE und Western Blot verwendeten Puffer und Lösungen sind wie folgend:

Anodenpuffer:

0,3 M Tris, 20% Methanol

Kathodenpuffer:

25 mM Tris, 40 mM 6-Aminohexansäure, 20% Methanol

PBS:

2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 2 mM KH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4 (pH 7,4)

Sammelgelpuffer:

1 M Tris/HCl (pH 6,8)

SDS-Laufpuffer:

250 mM Tris, 1,92 M Glycin, 1% SDS

SDS-Probenpuffer (Laemmli-puffer) (1x):

5% 2-Mercaptoethanol, 10% Glycerol, 62,5 mM Tris/HCl (pH 6,8), 2% SDS, 0,1% Bromphenolblau

Trenngelpuffer:

1,5 M Tris/HCl (pH 8,8).

Für die Detektion von mehr als einem Protein auf der Membran wurde diese für 30 min bei 56°C in dem Roti®-Free Stripping Puffer inkubiert und anschließend mehrere Male mit PBS/0,05% Tween20 gewaschen. Nach erneuter Blockierung mit 3% BSA/PBS konnte diese dann mit einem weiteren primären Antikörper inkubiert werden. Die gleichmäßige Beladung der SDS-PAGE wurde über die Detektion der β -Aktin- bzw. Vinculin-Expression überprüft (Ladekontrolle). Für die Quantifizierung der Proteinexpression wurden die Werte gegen die Ladekontrolle normalisiert und ins Verhältnis zu der Kontrollbehandlung gesetzt.

2.2.9. Proteindetektion durch Immunfluoreszenzfärbung und Immuncytochemie

Die Immunfluoreszenz und die Immuncytochemie wurden für die *in vitro* Detektion eines Proteins und für die *in vivo* Analyse der NIPP1-Proteinlokalisation in den Podozyten der Niere genutzt. Für die *in vitro* Versuche wurden die Podozyten in 4-Well-chamber slides kultiviert.

2.2.9.1. Immuncytochemie (ICC)

Für die immuncytochemischen Analysen wurden die Zellen nach dem Ablauf der Inkubationszeit mit einer 4%-igen Formaldehydlösung (+ 0,1% Triton X-100) für 30 min bei RT fixiert und permeabilisiert. Durch die Inkubation der Präparate mit einer 3%-igen H₂O₂-Lösung für 10 min bei RT wurden endogene Peroxidasen deaktiviert. Die anschließende Blockierung mit Ziege- bzw. Kaninchen-Serum für 1 h bei RT soll eine unspezifische Bindung der Antikörper verhindern. Die Präparate wurden über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper und anschließend für 60 min bei RT mit dem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert. Die für die verwendeten primären und sekundären Antikörper eingesetzten Verdünnungen sind den **Tabellen 9** und **10** zu entnehmen. Die Exposition der markierten Proteine

erfolgte durch Inkubation der Präparate mit Aminoethylcarbozol (AEC) bzw. 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) für 5 min. Für die Präparation der Negativkontrollen wurden die Zellen mit nicht-immunogenen Immunglobulin G (IgG) der entsprechenden Spezies, anstelle des primären Antikörpers, inkubiert. Die Objektträger wurden mit Kaisers Gelatine eingebettet und die Präparate lichtmikroskopisch analysiert. Für die densitometrische Quantifizierung der ICC wurde die relative Färbung mit der AxioVision Rel. 4.6. Software bestimmt. Die relative Proteinexpression der entsprechenden Behandlung wurde durch Normalisierung gegen die Kontrollbehandlung ermittelt.

2.2.9.2. Immunfluoreszenz (IF)

Für die Analyse der NIPP1-Proteinexpression in den Podozyten der Niere wurden Paraffinpräparate angefertigt, die einer NIPP1-Synaptopodin-Doppelfärbung unterzogen wurden. Die 4 µm Paraffinschnitte wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Für das Entparaffinieren der Schnitte wurden diese zunächst mit Xylol versetzt und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe hydriert. Für die Hitze-induzierte Antigen-Demaskierung wurden die Objektträger in Citratpuffer (pH 6,0; 2 mM Citronensäure, 10 mM Natriumcitrat) gekocht. Nach dem Abkühlen der Präparate wurden die Nierenschnitte mit dem DakoPen umrandet und für 1 h mit 5% BSA/PBS bei RT blockiert. Die Inkubation mit beiden primären Antikörpern erfolgte über Nacht bei 4°C. Für die Präparation der Negativkontrollen wurden die Zellen mit nicht-immunogenen IgG der entsprechenden Spezies, anstelle des primären Antikörpers, inkubiert. Vor der Inkubation mit dem FITC- bzw. Cy3-markierten sekundären Antikörper für 2 h bei RT im Dunkeln wurden die Präparate erneut für 30 min mit der 5%-igen BSA/PBS-Lösung versetzt. Die Inkubation mit den jeweiligen sekundären Antikörpern erfolgte getrennt voneinander. Für die Darstellung der Zellkerne wurde die DAPI-Färbung verwendet. Die Präparate wurden für 10 min mit der DAPI-Lösung (1:1000 in PBS) inkubiert. Die Objektträger wurden anschließend mit Kaisers Gelatine eingebettet und am LSM 510 analysiert. Die jeweilige Verdünnung der Antikörper sowie die Anregungs- und Detektionswellenlängen der eingesetzten Farbstoffe sind in den **Tabellen 9** und **10** aufgelistet.

2.2.10. Analyse der PP1-Phosphatase-Aktivität

NIPP1 ist eine regulatorische Untereinheit von PP1 und wirkt inhibierend auf dessen Phosphatase-Aktivität. Deshalb wurde die Änderungen der PP1-Phosphatase-Aktivität bei veränderter NIPP1-Expression unter Verwendung des ProFluor™ Ser/Thr Phosphatase Assay von Promega analysiert.

Für den Assay wurden 300 µg Proteinlysate direkt mit dem in dem Kit enthaltenen Phosphatase-Puffer, dessen Zusammensetzung den optimalen Bedingungen für PP1 entspricht, versetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,025 µl Phosphopeptid Bisamin-R110 (Rhodamin 110) gestartet. Das R110 ist ein Substrat für Ser/Thr-Phosphatasen und wird im phosphorylierten Zustand von Proteasen nicht gespalten. Wird es durch die aktive Phosphatase dephosphoryliert, kann es durch die dann zugegebene Protease gespalten werden und das hoch fluoreszierende R110 wird freigesetzt. Die bei einer Exzitation von 485 nm und einer Emission von 530 nm mit dem Tecan infinite Reader M200 und der i-control Software bestimmte Fluoreszenzintensität korreliert somit direkt mit der Phosphatase-Aktivität.

Um abzusichern, dass in den Analysen nur die Phosphatase-Aktivität von PP1 und nicht auch die der Proteinphosphatasen 2A und 2B berücksichtigt ist, wurden die Proteinlysate AGE-BSA behandelte Podozyten mit für PP1, PP2A und PP2B spezifischen Inhibitoren versetzt. Für die Hemmung von PP1 wurde der Inhibitor-2 (2 nM) verwendet, von PP2A Cantharidinsäure (50 nM) und von PP2B Fenvalerat (2 nM). Die Proben wurden für 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend dem ProFluor™ Ser/Thr Phosphatase Assay unter Verwendung der PP1-spezifischen Bedingungen unterzogen.

2.2.11. Bestimmung der zellulären Proliferationsrate

2.2.11.1. Ermittlung der BrdU-Inkorporationsrate

Der Effekt einer NIPP1-Suppression auf die Proliferationsrate der Podozyten wurde unter dem Gesichtspunkt der Inkorporationsrate von 5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU) in die DNS der Zellen analysiert. Dieses chemische Analogon der Pyrimidinbasen

Thymidin bzw. Uridin wird von den Zellen aufgenommen und in der S-Phase des Zellzyklus in die DNS eingebaut. Für den Assay wurden die Podozyten in 96-Well-Mikrotiterplatten kultiviert. Nach einer Inkubationszeit von 20 h, 44 h und 68 h wurde das BrdU-*Labeling*-Reagenz zu den Zellen gegeben und diese für weitere 4 h unter normalen Zellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, lysiert und dabei die genomische DNS denaturiert. Die BrdU-markierten Positionen in der DNS wurden durch einen Peroxidase-gekoppelten anti-BrdU-Antikörper lokalisiert. Nach der Zugabe eines entsprechenden Peroxidase-Substrats wurde die BrdU-Inkorporationsrate durch das Messen der Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm mit dem Tecan infinite Reader M200 quantifiziert.

2.2.11.2. Bestimmung der Proliferationsrate über die zelluläre Vitalität

Ein weiteres Kriterium für die Proliferationsrate ist die zelluläre Vitalität. Mit dem CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay wurde die Anzahl lebender Zellen bestimmt. Dazu wurde zu den in einer 96-Well-Mikrotiterplatte kultivierten Zellen nach Ablauf der Inkubationszeit von 24 h, 48 h und 72 h die Tetrazoliumkomponente MTS und ein Elektronen bindendes Reagenz (Phenazinethosulfat, PES) gegeben und diese für weitere 1 h bis 4 h inkubiert. Durch das in metabolisch aktiven Zellen von Dehydrogenasen synthetisierte NADPH bzw. NADH wird die MTS-Tetrazoliumkomponente zu einem farbigen Formazanprodukt reduziert. Dessen Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 490 nm mit dem Tecan infinite Reader M200 gemessen und ist direkt proportional zur Zellzahl.

2.2.12. Quantifizierung der zellulären Hypertrophie

2.2.12.1. Ermittlung des Protein-Zellzahl Verhältnisses

Um eine mögliche Hypertrophie der Podozyten zu quantifizieren wurde die Proteinkonzentration einer definierten Anzahl an Zellen bestimmt. Die Podozyten wurden in 6-Well-Zellkulturplatten kultiviert. Nach dem Ablauf der 24-stündigen Inkubationszeit wurden die Zellen mit Accutase vom Untergrund gelöst und für 2 min bei 250 rcf zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in PBS resuspendiert und 1/5

davon für die Zellzählung am CASY® Model DT verwendet. Die restliche Lösung wurde erneut zentrifugiert, das Zellpellet mit Lysepuffer versetzt und für 30 min auf Eis lysiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand für die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (siehe 2.2.7.) verwendet. Der ermittelte Proteingehalt wurde in μg Protein pro 10^3 Zellen angegeben und das Verhältnis zur jeweiligen Kontrolle bestimmt.

2.2.12.2. Bestimmung des zellulären Umfangs

Ein weiteres Kriterium für eine zelluläre Hypertrophie ist die Zellgröße und damit der Umfang der Zellen. Für dessen Bestimmung wurden NIPP1 siRNS transfizierte Podozyten und entsprechende Kontrollzellen nach 24 h Inkubation lichtmikroskopisch aufgenommen und ihr Umfang mithilfe der AxioVision Rel. 4.6. Software bestimmt.

2.2.13. Zellzyklusanalyse durch Propidiumjodid-Färbung

Der Einfluss der NIPP1-Suppression, infolge einer Behandlung mit AGE-BSA oder siRNS Transfektion, auf den Zellzyklusverlauf der Podozyten wurde über die Inkorporation des Nukleinsäureinterkalator Propidiumjodid (PI) in die DNS der Zellen analysiert. Da der Farbstoff die intakte Zellmembran nicht passieren kann, muss diese vor der Behandlung permeabel gemacht werden. Dazu wurden die Podozyten mit Accutase gelöst, für 2 min bei 250 rcf zentrifugiert, das Zellpellet in eiskaltem 70%-igen Ethanol resuspendiert und die Zellen für mindestens 1 h bei 4°C fixiert. Die Suspension wurde zentrifugiert und das Zellpellet zweimal mit PBS/0,5% Tween-20 gewaschen. Um falsch-positive Signale durch doppelsträngige RNS zu unterbinden, wurde der Lösung DNase-freie RNase (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) beigefügt und für 10 min bei RT inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Suspension mit der PI-Lösung (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 10 min bei 4°C versetzt und der DNS-Gehalt mit dem FL2-Kanal des BD FACSCalibur™ gemessen. Es wurden Änderungen im Zellzyklus nach 24 h und 48 h Inkubation analysiert. Für die Zellzyklusanalyse mit dem FACS wurden die Podozyten in 6-Well-Zellkulturplatten kultiviert.

2.2.14. Messung von Apoptose

2.2.14.1. *In situ cell death detection*, POD (TUNEL Assay)

Für die Detektion apoptotischer Aktivität nach Behandlung der Podozyten mit AGE-BSA bzw. NIPP1 siRNS Transfektion wurde der *In situ cell death detection* Assay von Roche verwendet. Dafür wurden die Podozyten in 4-Well-chamber slides kultiviert und nach dem Ablauf der 24-stündigen Inkubationszeit, wie unter 2.2.9.1. beschrieben, fixiert und permeabilisiert. Für die Positivkontrolle wurden in 10% FKS-haltigem RPMI 1640-Medium inkubierte Podozyten für 10 min mit DNase I (10 mg/ml) behandelt. Die Zellen wurden für 30 min bei RT mit der Blockierlösung (0,5 M Tris/HCL (pH 7,5), 3% BSA, 20% FKS) inkubiert. Im Anschluss an eine dreimalige Waschprozedur erfolgte die Detektion von den bei der Apoptose entstehenden Bruchstücken genomischer DNS durch Übertragung von mit Fluorescein-markierten dUTPs auf freie 3'-OH-Enden durch die terminale Transferase. Nach der Inkubation mit der Converter-POD-Lösung des Kits, welche einen POD-markierten anti-Fluorescein-Antikörper beinhaltet, wurde das POD-Substrat DAB zugegeben und die Präparate für 10 min bei RT inkubiert. Die Objektträger wurden mit Kaisers Gelatine eingebettet und die Präparate lichtmikroskopisch ausgewertet. Die Intensität der Färbung wurde mit der AxioVision Rel. 4.6 Software bestimmt.

2.2.14.2. Annexin-V Assay

Um zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen differenzieren zu können, wurde der Annexin-V-FLUOS Staining Kit von Roche verwendet. Entsprechend behandelte Podozyten wurden in 6-Well-Zellkulturplatten kultiviert. Als Positivkontrolle dienten für 24 h mit 1 μ M Staurosporin behandelte Zellen. Für die Negativkontrolle wurden die Zellen mit 10% FKS inkubiert. Nach dem Ablauf der Inkubationszeit von 24 h wurden die Podozyten mit PBS gewaschen und mit Accutase gelöst. Durch Resuspension der Zellen in der Färbelösung wurden diese simultan sowohl mit der Annexin-V-FLUOS- als auch mit der PI-Lösung inkubiert. Die markierten Proben wurden mit dem BD FACSCalibur™ analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung der WinMDI 2.9 Software.

2.2.15. Blockierung von RAGE

Um eine Beteiligung von RAGE an der Suppression von NIPP1 zu testen, wurden die Podozyten nach dem Starvieren und vor der Inkubation mit AGE-BSA mit einem murinen RAGE-Antikörper in einer Arbeitskonzentration von 25 µg/µl (angesetzt in 0,1% FKS RPMI 1640-Medium) für 4 h vorinkubiert. So wurden die Bindestellen des Rezeptors durch den Antikörper blockiert um bei der anschließenden 24-stündigen Inkubation mit AGE-BSA eine Rezeptorbindung weitestgehend zu verhindern. Damit kann die Signaltransduktion minimiert werden. Die AGE-BSA-Lösung war ebenfalls mit dem RAGE-Antikörper versetzt um eine kompetitive Verdrängung zu unterbinden. Als Kontrolle dienten mit Co-BSA und AGE-BSA behandelte Podozyten, sowie die Inkubation der Zellen mit Co-BSA und RAGE bzw. AGE-BSA und Ziege-IgG (eingesetzt in der gleichen Arbeitskonzentration wie der RAGE-Antikörper). Die Expression von NIPP1 wurde durch RT PCR und Western Blot analysiert.

2.2.16. NFκB-Promotorassay

Die Analyse der transkriptionellen Aktivität von NFκB wurde anhand eines Gen-Reporterassays bestimmt. Dafür wurden die Podozyten parallel mit 2 µg des Luciferase-Reporterplasmids pNFκB-Luc und 10 nM NIPP1 siRNS bzw. 10 nM co siRNS mithilfe des NEONTM-Transfektionssystems transfiziert (siehe 2.2.3.) und in 6-Well-Zellkulturplatten für 24 h inkubiert. Das Plasmid beherbergt die Firefly-Luciferase unter der Kontrolle eines TATA-ähnlichen Promotors. Dieser ist mit mehreren Kopien der NFκB-Konsensussequenz fusioniert. Nach der Bindung von endogenem NFκB an das kappa-Enhancer-Element des Plasmids wird die Transkription des Reportergens aktiviert. Für die Analyse der NFκB-Aktivität bei Behandlung der Podozyten mit AGE-BSA wurden die Zellen nur mit dem pNFκB-Luc transfiziert, über Nacht starviert und dann für 24 h mit 5 mg/ml AGE-BSA inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubationen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 100 µl Luciferase-Zellkulturlysepuffer (Promega) lysiert. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration unter Verwendung des Bradford-Reagenz wurden die Proben

mit einer einheitlichen Proteinkonzentration in einem Volumen von 20 µl für den Luciferase Assay verwendet. Unmittelbar nach der Zugabe von 100 µl Luciferase-Substrat wurde die Lumineszenz mithilfe des Tecan infinite Reader M200 gemessen.

2.2.17. Genotypisierung der *db/db*-Mäuse

Die NIPP1-Expression wurde in den Podozyten diabetischer Mäuse (*db/db*-Tiere; *background strain*: C57BL/6J, molekularer Hintergrund: LepR^{*db/db*}; Jackson Laboratory) analysiert. Diese besitzen eine autosomal rezessive Punktmutation (Guanosin zu Thymidin Transversion) in beiden Allelen des Gens für den Leptinrezeptor. Hieraus folgt aufgrund einer Hyperphagie die Entwicklung eines T2DM. Als Kontrollen dienten heterozygote *db/m*-Mäuse, die keinen T2DM entwickeln. Die Mäuse wurden in einem Alter von drei bis vier Wochen genotypisiert. Dafür wurde die genomische DNS aus den Schwanzbiopsien der Mäuse mit dem NucleoSpin® Tissue Kit nach Herstellerangaben isoliert und in einem Volumen von 50 µl eluiert. Die Genotypisierung erfolgte gemäß dem Protokoll von „Jackson Laboratory“ (<http://jaxmice.jax.org/protocolsdb>). Für die konventionelle PCR wurde der GoTaq® Green Master Mix von Promega eingesetzt. Ein PCR-Ansatz mit einem Endvolumen von 20 µl setzte sich aus 10 µl GoTaq® Green Master Mix, je 1 µl Forward- und Reverse-Primer (Endkonzentration von 5 µM) sowie 1 µg genomischer DNS zusammen. Die Sequenzen der genutzten Primer sind in **Tabelle 7** aufgeführt. Die Reaktionsbedingungen für die Amplifikation waren wie folgend:

1	90 s	94°C
2	30 s	94°C
3	45 s	52°C
4	45 s	72°C
Schritt 2 bis 4 in 35 Zyklen		
5	2 min	72°C
6	∞	4°C.

Die PCR-Produkte wurden über Nacht mit dem Restriktionsenzym RsaI inkubiert. Die RsaI-Erkennungssequenz ist nur bei dem mutierten Allel vorhanden. Nach dem Restriktionsverdau wurden die Nukleotidsequenzen über ein 3%-iges TBE (Tris-Borat-EDTA)-Agarosegel, versetzt mit Ethidiumbromid, elektrophoretisch aufgetrennt und im Anschluss unter einer UV-Quelle begutachtet (**Abb. 11**). Die Amplifikate des nicht mutierten Allels besitzen eine Fragmentgröße von 135 bp. Durch den Verdau existieren für das mutierte Allel zwei Fragmente mit einer Größe von 108 bp und 27 bp, wobei letzteres im Agarosegel nicht detektiert werden kann.

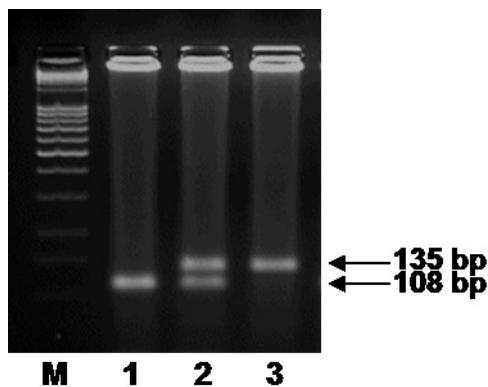


Abb. 11: Repräsentatives Agarosegel für die Genotypisierung der *db/db*-Tiere.

Die linke Bande (1) ist charakteristisch für einen *db/db*-Genotyp, die mittlere (2) für *db/m* und die rechte (3) für den Wildtyp; M = 100 bp Marker, 1 = *db/db*, 2 = *db/m*, 3 = Wildtyp.

2.2.18. Analyse der glomerulären NIPP1-Expression in diabetischen Mäusen

Für die *in vivo* Untersuchungen der NIPP1-Proteinexpression wurden jeweils fünf *db/db*- und *db/m*-Mäuse verwendet. Die Tiere waren etwa 16 Wochen alt, da sich die Diabetische Nephropathie im *db/db*-Mausmodell bereits nach 3 Monaten zu entwickeln beginnt [74].

Die Mäuse wurden nach dem Narkotisieren für 2 min mit PBS (5 ml/min) und anschließend für 8 min mit 4% Paraformaldehyd perfundiert. Die entnommenen

Nieren wurden über Nacht bei 4°C in 5% Formalin gelagert und im Anschluss gewässert. Bei der Paraffineinbettung der Nieren in der Histokinette wurde zunächst das Wasser in einer aufsteigenden Alkoholreihe schrittweise verdrängt und danach der Alkohol durch das Lösungsmittel Xylol ersetzt. Dann wurden die Nieren mit flüssigen Paraffin (56°C) versetzt. Die Paraffinblöcke wurden bei RT dunkel gelagert.

2.2.19. Statistische Analysen

Alle Werte wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die statistischen Analysen wurden unter Verwendung des Statistikprogramms SPSS für Windows Version 11.0 durchgeführt. Für den Vergleich von mehr als 2 Gruppen wurde der Kruskal-Wallis Test verwendet, gefolgt von dem Mann-Whitney U-Test. Unterschiede zwischen verschieden behandelten Proben wurden als signifikant erachtet, wenn $p < 0,05$ war.

3. Ergebnisse

3.1. Einfluss von AGE-BSA auf die Expression des nuklearen Inhibitors von PP1 (NIPP1)

Die bei dem *Diabetes Mellitus* herrschende Hyperglykämie fördert die Bildung und Akkumulation von AGEs. Diese wiederum schädigen über Rezeptor-unabhängige und Rezeptor-abhängige Mechanismen die Podozyten *in vivo* [5]. Um die Wirkung einer AGE-Exposition auf die Podozyten *in vitro* zu analysieren, wurde eine murine, konditional differenzierte Podozytenzelllinie [85] und ein im Labor präpariertes, glykiertes BSA (AGE-BSA) verwendet. Als Kontrolle diente nicht glykiertes BSA (Co-BSA). Für die Untersuchungen wurden die Podozyten für 24 h mit jeweils 5 mg/ml Co-BSA bzw. AGE-BSA behandelt und die Expression von NIPP1 in den Podozyten detaillierter analysiert.

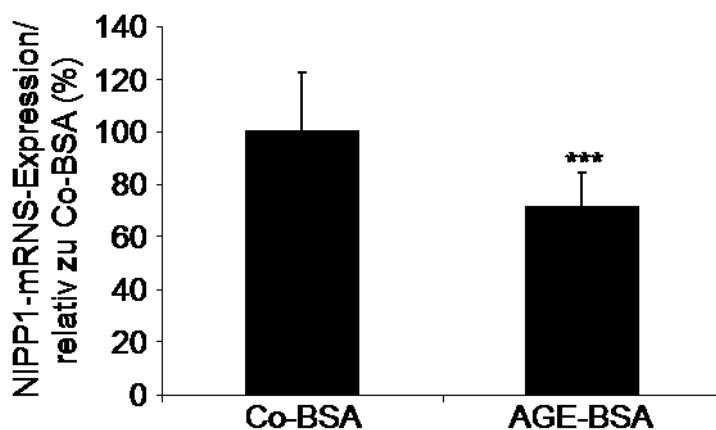


Abb. 12: RT PCR Analyse der NIPP1-mRNS-Expression bei Behandlung der Podozyten mit AGE-BSA.

Die Inkubation der Podozyten mit AGE-BSA verursachte eine signifikant verminderte mRNS-Expression von NIPP1 im Vergleich zu Co-BSA; n = 18, *** p<0,001 versus Co-BSA.

Initiale Untersuchungen bestätigten zunächst, dass NIPP1 in differenzierten Podozyten exprimiert wird. Die Analyse der NIPP1-mRNS-Expression in mit AGE-BSA behandelten Podozyten durch RT PCR zeigte eine signifikant geringere NIPP1-mRNS-Expression im Vergleich zu der Inkubation mit Co-BSA (**Abb. 12**).

Um zu überprüfen, ob auch auf Proteinebene Änderungen zu detektieren sind, wurde die NIPP1-Expression durch Western Blots und ICC untersucht. Die Western Blot Analysen zeigten eine signifikant geringere NIPP1-Expression bei Behandlung der Podozyten mit AGE-BSA im Vergleich zu Co-BSA (**Abb. 13A**). Die immunocytochemischen Aufnahmen bestätigten die Western Blot Daten. Wie die **Abbildung 13B** zeigt, war die NIPP1-Proteinexpression bei Behandlung der Podozyten mit AGE-BSA signifikant geringer als bei der Kontrollbehandlung. Zudem konnte mit der ICC verdeutlicht werden, dass NIPP1 sowohl bei Inkubation mit Co-BSA als auch mit AGE-BSA in den Podozyten eine vorwiegend nukleare Lokalisation besitzt und nur ein geringer Teil des Proteins im Zytoplasma zu finden ist.

Mit diesen Analysen konnte gezeigt werden, dass AGE-BSA die Expression von NIPP1 auf mRNS- und Proteinebene in den Podozyten supprimiert.

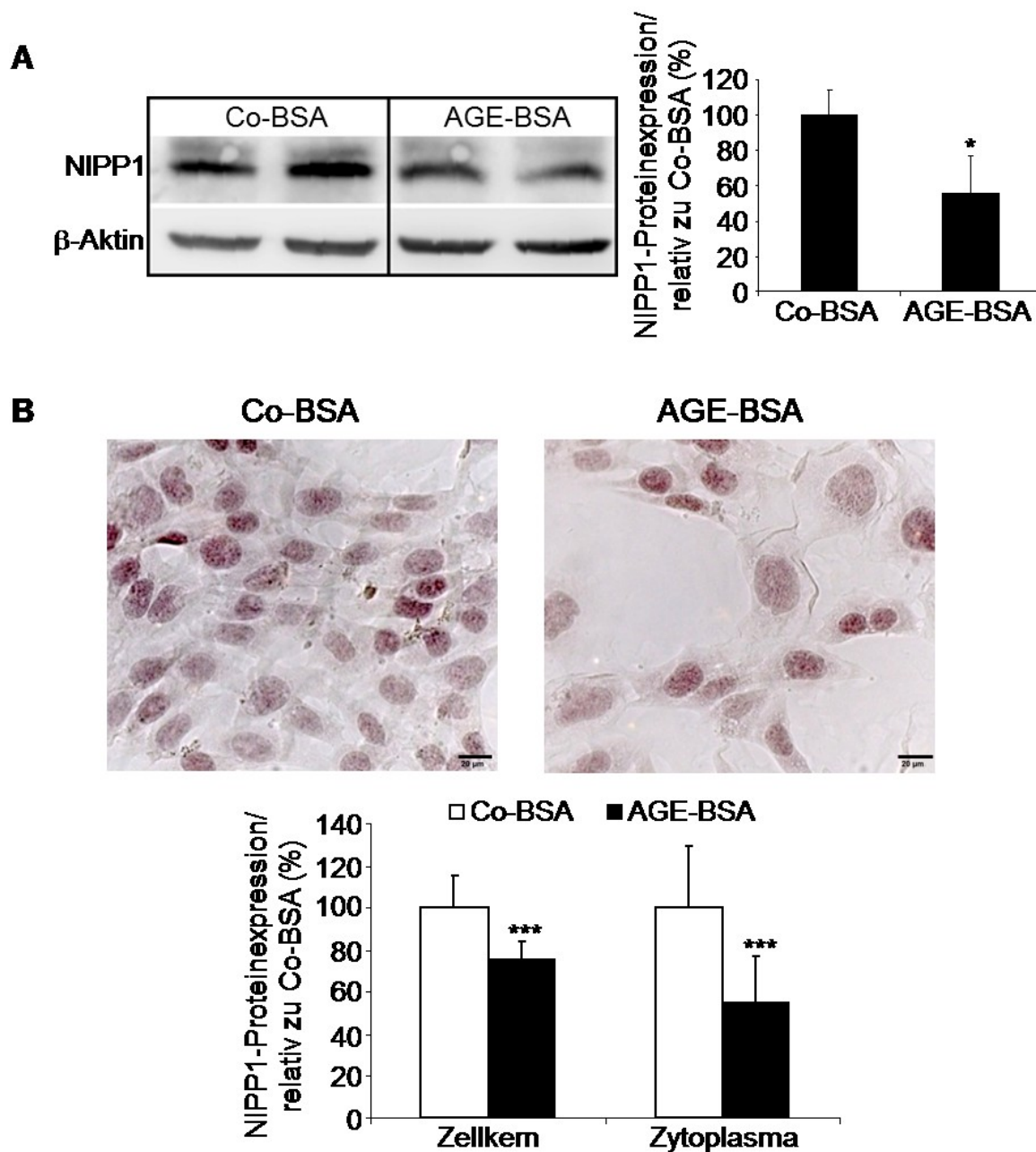


Abb. 13: NIPP1-Proteinexpression in den Podozyten bei Behandlung mit AGE-BSA.

(A) Western Blot Analyse von NIPP1 (42 kDa). Mit den Untersuchungen konnte eine signifikant verminderte NIPP1-Expression bei AGE-BSA Behandlung belegt werden. Die gleichmäßige Beladung der SDS-Gele wurde über die Detektion von β -Aktin überprüft; repräsentativer Western Blot; n = 9; * $p < 0,05$ versus Co-BSA. (B) Immunocytochemische Untersuchungen zu NIPP1; repräsentative Aufnahmen (Vergrößerung: 400x). Die Abbildungen zeigen die NIPP1-Suppression in AGE-BSA behandelten Podozyten im Vergleich zu Co-BSA. Es ist die nukleare Lokalisation von NIPP1 zu erkennen; n = 6, Analyse von 200 Zellen; *** $p < 0,001$ versus Co-BSA.

3.2. Einfluss von AGE-BSA auf die Proteinphosphatase 1

NIPP1 ist eine regulatorische Untereinheit von PP1, welche im unphosphorylierten Zustand die Phosphatase-Aktivität von PP1 inhibiert [100]. Deshalb wurde analysiert, ob eine Behandlung der Podozyten mit AGE-BSA auch Einfluss auf die Proteinexpression von PP1 ausübt. Des Weiteren wurde untersucht, welchen Einfluss die Suppression von NIPP1 auf die Aktivität von PP1 hat.

3.2.1. Expression von PP1 in den Podozyten bei Behandlung mit AGE-BSA

Für die Analyse der Expression von PP1 wurden die Podozyten für 24 h mit 5 mg/ml AGE-BSA, für die Kontrollreaktion entsprechend mit Co-BSA, inkubiert. Zunächst wurde die PP1-mRNS-Expression in RT PCRs überprüft. Die Daten zeigten keine signifikanten Unterschiede in der PP1-mRNS-Expression zwischen der Co-BSA und der AGE-BSA Behandlung der Podozyten (**Abb. 14**).

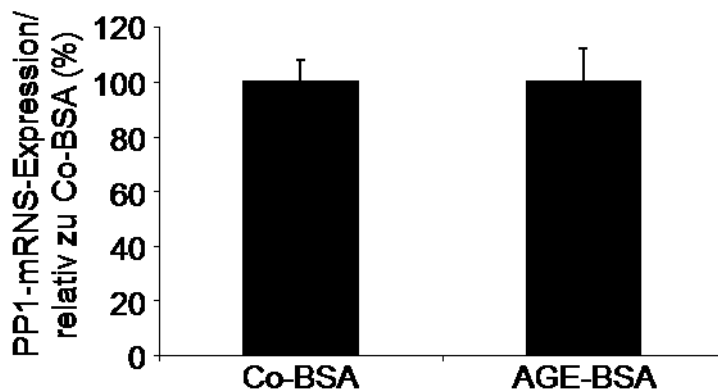


Abb. 14: Analyse der PP1-mRNS-Expression AGE-BSA behandelter Podozyten.

Mit der RT PCR konnten keine Differenzen hinsichtlich der PP1-mRNS-Expression zwischen Co-BSA und AGE-BSA behandelten Podozyten detektiert werden; n = 18.

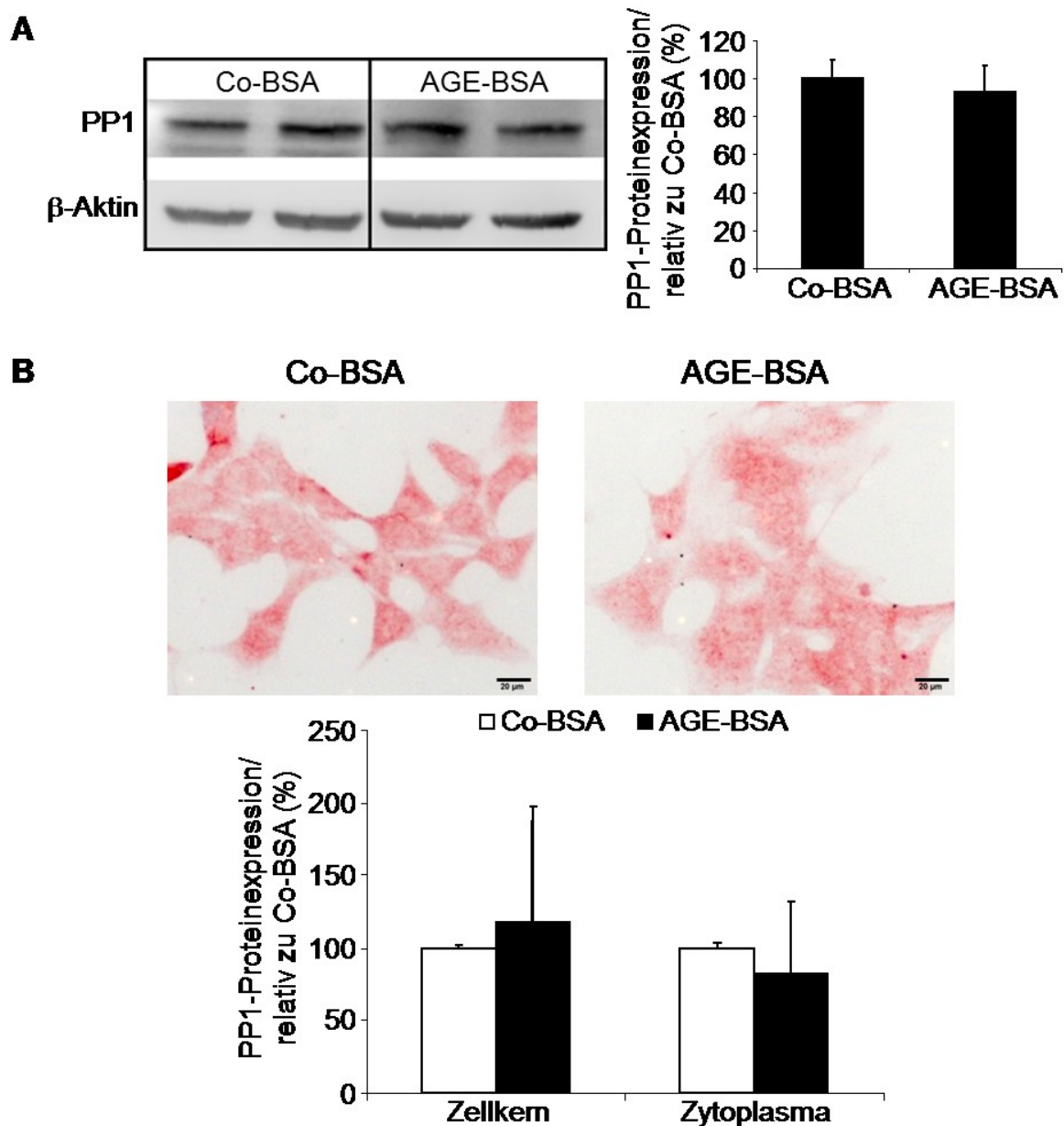


Abb. 15: Einfluss von AGE-BSA auf die PP1-Proteinexpression in den Podozyten.

(A) Western Blot Untersuchungen zu PP1 (36 kDa). AGE-BSA behandelte Podozyten zeigten keinen Unterschied hinsichtlich der PP1-Expression auf Proteinebene im Vergleich zu der Kontrollbehandlung. Die Detektion von β -Aktin diente dazu, die gleichmäßige Beladung der SDS-Gele zu überprüfen; repräsentativer Western Blot; n = 9. (B) Immunocytochemische Analyse von PP1. Mit der ICC konnte eine sowohl zytoplasmatische als auch nukleare PP1-Lokalisation bei Behandlung mit Co-BSA und AGE-BSA beobachtet werden, wobei keine Änderungen in der PP1-Proteinexpression zu detektieren waren. Den Abbildungen ist zu entnehmen, dass AGE-BSA eine tendenzielle PP1-Translokation vom Zytosol in den Zellkern induzierte; repräsentative Aufnahmen (Vergrößerung: 400x); n = 6, Analyse von 200 Zellen.

Um zu analysieren, ob Änderungen auf Proteinebene existieren, wurde die PP1-Proteinexpression durch Western Blots und ICC untersucht. Die Western Blot Untersuchungen zeigten keine Änderung in der PP1-Proteinexpression bei Inkubation der Zellen mit AGE-BSA im Vergleich zu der Kontrolle (**Abb. 15A** und **15B**). Die immunocytochemischen Analysen bestätigten dies. Ihnen kann aber entnommen werden, dass AGE-BSA eine tendenzielle Translokation des Proteins von dem Zytoplasma in den Zellkern induzierte, verglichen mit Co-BSA (**Abb. 15B**).

3.2.2. Einfluss der verminderten Expression von NIPP1 auf die PP1-Enzymaktivität

Da NIPP1 als inhibierende Untereinheit von PP1 bekannt ist, wurde die Aktivität der Phosphatase bei Suppression von NIPP1 durch AGE-BSA analysiert. Hierzu wurde jeweils dieselbe Menge an Protein von für 24 h mit Co-BSA und AGE-BSA behandelten Podozyten in dem ProFluor™ Ser/Thr Phosphatase Assays eingesetzt. Als Substrat für die Phosphatase wurde das Phosphopeptid Bisamin-Rhodamin 110 (R110) verwendet, welches im unphosphorylierten Zustand als Substrat für die später beigefügte Protease dient. Das bei der proteolytischen Spaltung frei werdende, fluoreszierende R110 korreliert direkt mit der Aktivität von PP1. Die Resultate des Phosphatase Assays zeigten eine signifikant erhöhte PP1-Phosphatase-Aktivität bei Inkubation der Podozyten mit AGE-BSA im Vergleich zu der Kontrollbehandlung mit Co-BSA (**Abb. 16A**).

Um auszuschließen, dass in die Messungen die Aktivitäten der Proteinphosphatasen PP2A und PP2B einfließen, wurden die Proteinlysate von mit AGE-BSA behandelten Podozyten (24 h Inkubation) mit jeweils spezifischen Inhibitoren für die Moleküle versehen. Wie der **Abbildung 16B** zu entnehmen ist, bedeutete eine Inkubation mit dem Inhibitor-2, welcher spezifisch für PP1 ist, eine signifikant verminderte PP1-Phosphatase-Aktivität, wohingegen die Inkubation mit den Inhibitoren für PP2A (Cantharidinsäure) und PP2B (Fenvalerat) keine Änderungen zu der AGE-BSA Inkubation erbrachte. Die Behandlung der Lysate mit allen drei Inhibitoren induzierte eine signifikant geringere Aktivität von PP1 im Vergleich zu den Kontrolllysaten, die

mit keinem der drei Inhibitoren versehen wurden, und entsprach in etwa dem für die Inkubation mit dem Inhibitor-2 detektierten Wert.

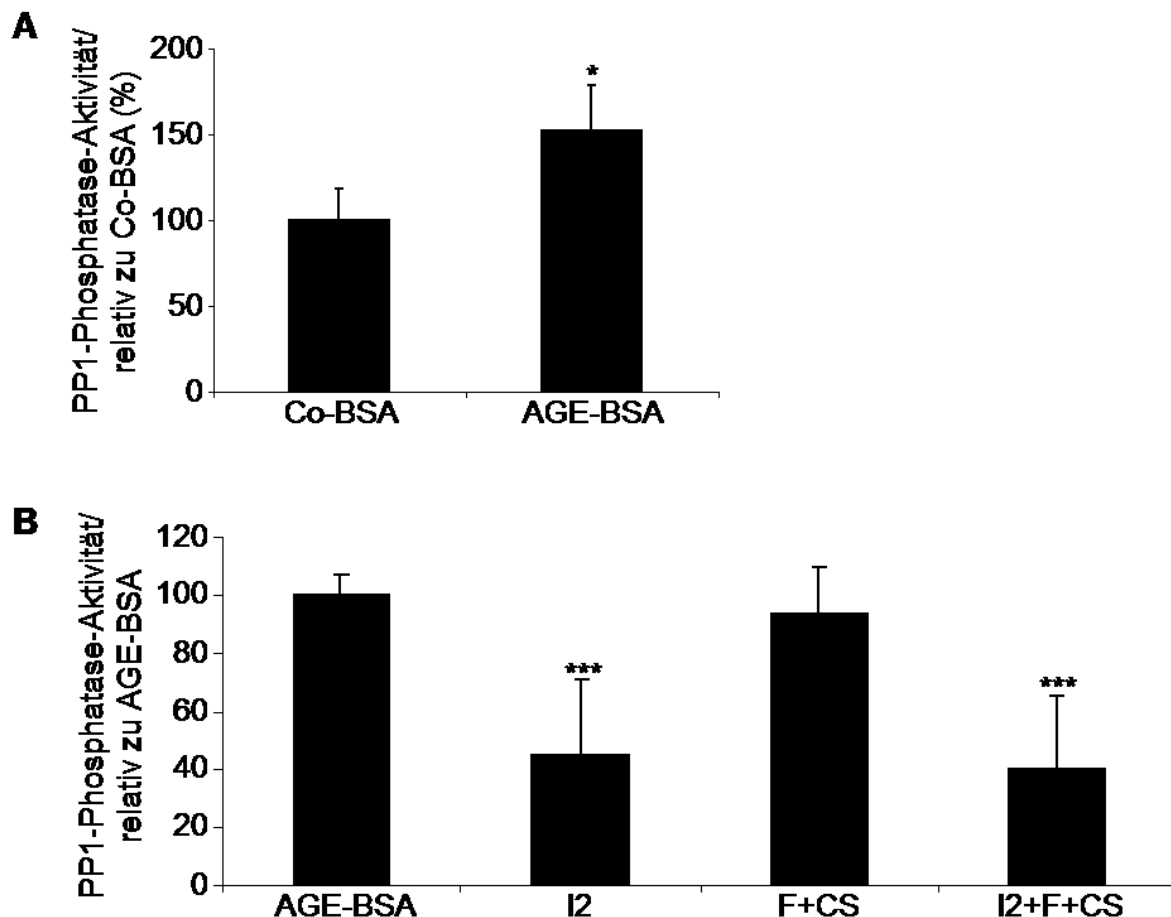


Abb. 16: Einfluss von AGE-BSA auf die Phosphatase-Aktivität von PP1.

(A) PP1-Aktivität in mit AGE-BSA behandelten Podozyten. Die Messung zeigte eine signifikant gesteigerte Aktivität von PP1 bei Inkubation der Zellen mit AGE-BSA im Vergleich zu Co-BSA; $n = 9$; $*p < 0,05$ versus Co-BSA. (B) Überprüfung der für PP1 spezifischen Bedingungen. Die Analysen belegten eine signifikant verminderte Phosphatase-Aktivität bei Inkubation der Lysate AGE-BSA behandelter Podozyten mit dem Inhibitor-2 bzw. aller drei Inhibitoren im Vergleich zu den reinen Lysaten der mit AGE-BSA behandelten Zellen. Die mit Cantharidinsäure und Fenvalerat versetzten Lysate zeigten keinen Unterschied zu der Kontrolle; $n = 6$; $***p < 0,001$ versus AGE-BSA; I2 = Inhibitor 2, F = Fenvalerat, CS = Cantharidinsäure.

3.3. Suppression der NIPP1-Expression mithilfe von siRNS Transfektion

Es sollte die Bedeutung der AGE-BSA-induzierten NIPP1-Suppression für die Podozyten weiter analysiert werden. Dazu wurde die NIPP1-Expression in den Podozyten über die Transfektion mit NIPP1 siRNS unterdrückt. Für die Analysen wurden die Zellen mit 10 nM NIPP1 siRNS bzw. mit 10 nM co siRNS (*non-silencing* siRNS) unter Verwendung des NEONTM-Transfektionssystems transfiziert.

3.3.1. Analyse der Stabilität der transienten Transfektion

Die Effektivität der NIPP1 siRNS Transfektion wurde in einer Zeitreihe ermittelt. Zu diesem Zweck wurde die NIPP1-mRNS-Expression in den Podozyten 6 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Transfektion durch RT PCR analysiert. Die Resultate zeigten, dass die NIPP1-mRNS-Expression bereits 6h nach der Transfektion durch die siRNS unterbunden wird und die Suppression über 48 h stabil ist. Aufgrund des transienten Charakters der Transfektion war 72 h nach der Transfektion eine wieder gestiegene NIPP1-mRNS-Expression zu detektieren (**Abb. 17A**). Zur Analyse der NIPP1-Proteinexpression nach siRNS Transfektion wurde NIPP1 immuncytochemisch zu den oben genannten Zeitpunkten nachgewiesen. Die Immuncytochemie verdeutlichte zunächst, dass NIPP1 bei co siRNS Transfektion ebenfalls eine nukleare Lokalisation besitzt, vergleichbar zu der Co-BSA Behandlung (**Abb. 17B**). Die Aufnahmen zeigten, dass die durch NIPP1 siRNS Transfektion induzierte verminderte NIPP1-Expression auch auf Proteinebene bis zu 48 h nach der Transfektion nachzuweisen ist. Erst nach 72 h fand sich eine wieder erhöhte NIPP1-Proteinexpression. Die Kontrolltransfektion mit co siRNS zeigte keinen Effekt auf die NIPP1-Expression (**Abb. 17B**).

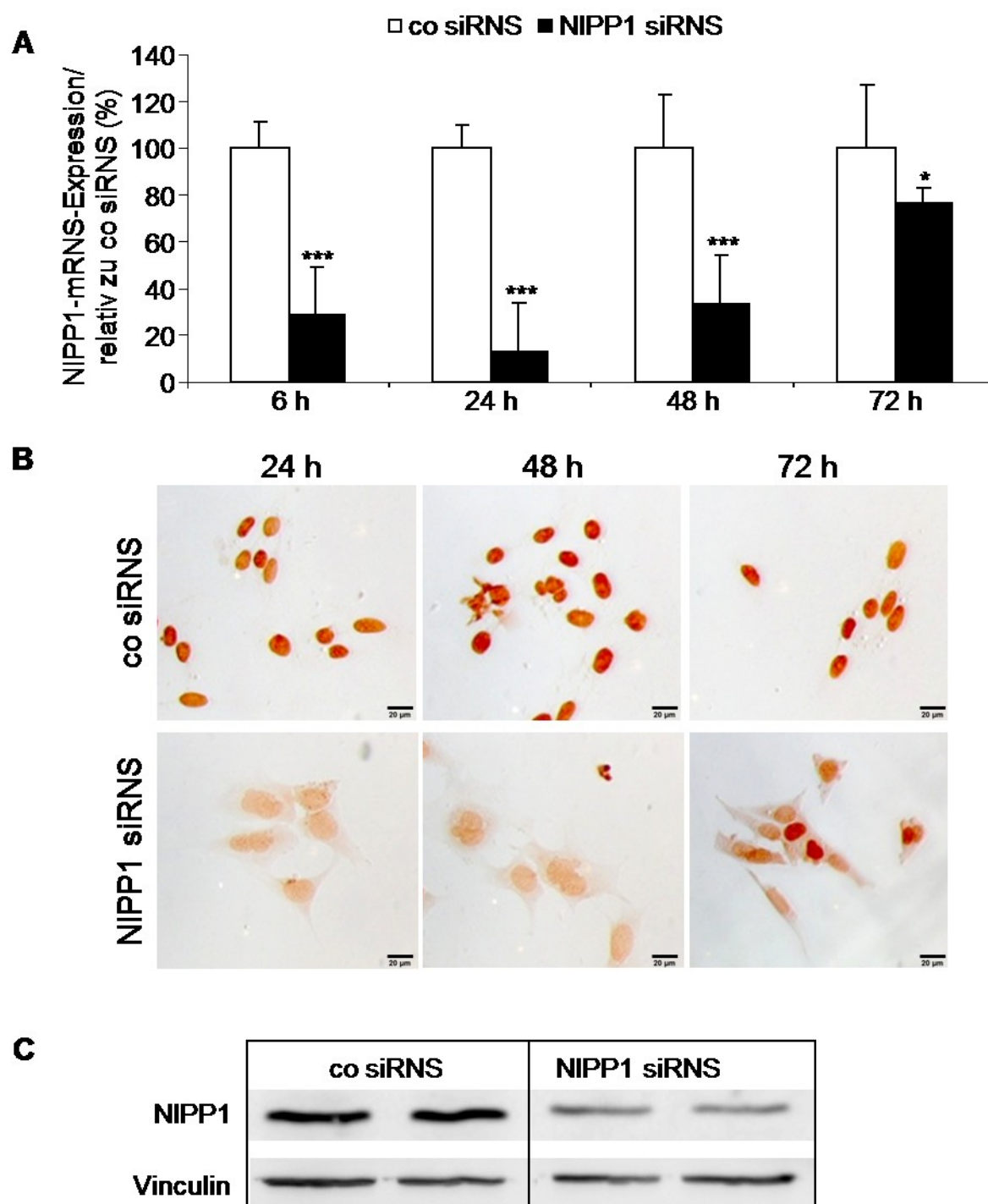


Abb. 17: Analyse der NIPP1-Expression nach Transfektion mit NIPP1 siRNS.

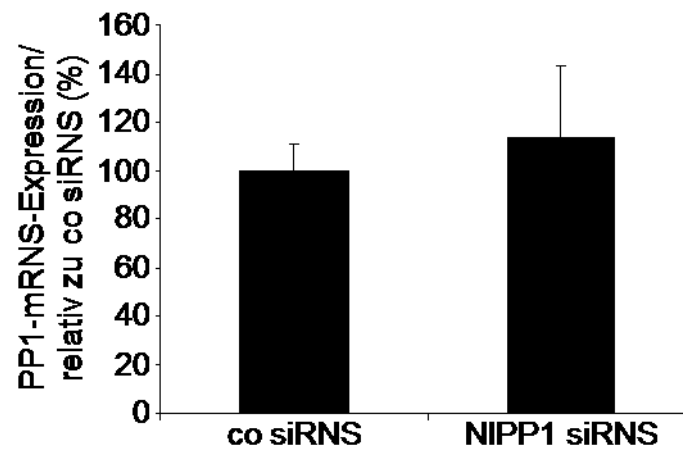
(A) RT PCR Analyse der NIPP1-mRNS-Expression. Die Daten zeigten eine NIPP1-Suppression auf mRNS-Ebene bereits 6 h nach Transfektion mit NIPP1 siRNS, die bis zu 48 h anhält. Die NIPP1-Expression nahm 72 h nach Transfektion wieder zu; $n = 6$; $***p < 0,001$, $*p < 0,05$ versus co siRNS. (B) Immunocytochemie der NIPP1-Proteinexpression. Die ICC belegte eine verminderte NIPP1-Proteinexpression bei Transfektion mit NIPP1 siRNS im Vergleich zu co siRNS für die 24 h und 48 h Inkubation; repräsentative Aufnahmen (Vergrößerung: 400x); $n = 3$. (C) Western Blot Untersuchung von NIPP1. Western Blots zeigten, dass die Transfektion der Podozyten mit NIPP1 siRNS die NIPP1-Proteinexpression 24 h nach Transfektion im Vergleich zu der Kontrolle supprimiert. Die gleichmäßige Beladung der SDS-Gele wurde durch die Detektion von Vinculin überprüft; repräsentativer Western Blot; $n = 4$.

Für alle weiteren Analysen wurde daher 24 h als Inkubationsdauer gewählt. Die NIPP1-Proteinexpression bei einer 24-stündigen Inkubation der Zellen wurde ebenfalls in Western Blots analysiert. Die Untersuchungen zeigten eine verminderte NIPP1-Expression bei Transfektion mit NIPP1 siRNS im Vergleich zu co siRNS (**Abb. 17C**). Es kann also festgestellt werden, dass sich die NIPP1-mRNS- und Proteinexpression durch die Transfektion mit NIPP1 siRNS für bis zu 48 h supprimieren lässt.

3.3.2. Effekt der NIPP1 siRNS Transfektion auf die PP1-Expression und -Aktivität

Es wurde die Auswirkung der Transfektion der Podozyten mit NIPP1 siRNS auf die PP1-Expression und auf die Enzymaktivität der Phosphatase untersucht. Die Analysen sollten zeigen, ob die NIPP1-Suppression bei Behandlung der Podozyten mit AGE-BSA und bei Transfektion mit NIPP1 siRNS ähnliche Effekte hinsichtlich PP1 auslösen. Das ist von Bedeutung, wenn im Weiteren über die siRNS Transfektion die Relevanz von NIPP1 für die Podozyten bestimmt werden soll, da NIPP1 und PP1 als direkte Interaktionspartner in der Zelle fungieren.

A



B



C

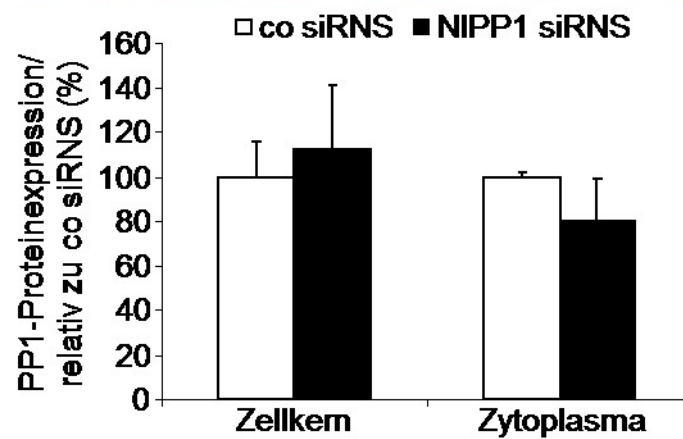
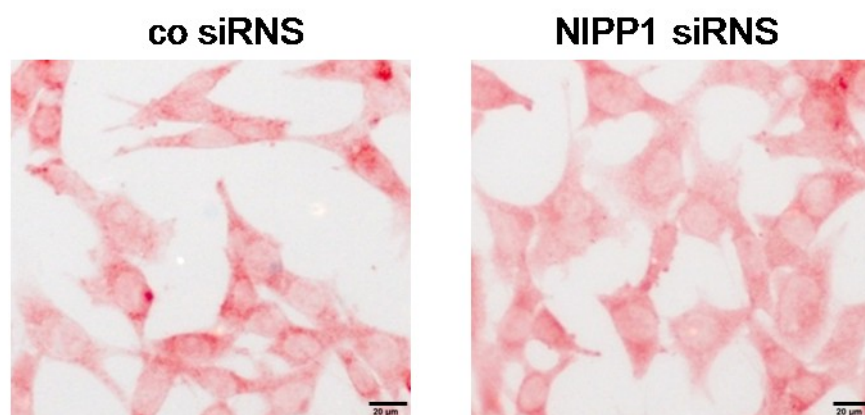
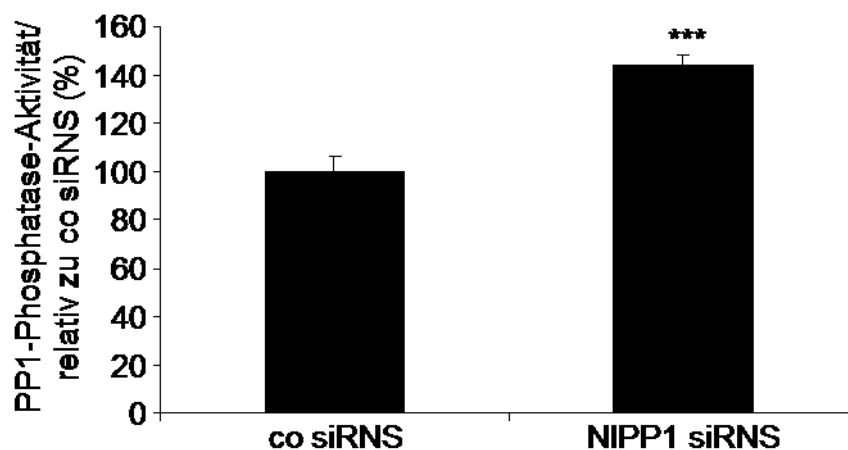


Abb. 18: Einfluss der NIPP1-Suppression auf die Expression von PP1.

(A) Analyse der PP1-mRNS-Expression durch RT PCR. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Transfektion mit co siRNS und NIPP1 siRNS detektiert werden; n = 18. (B) Repräsentativer Western Blot der PP1-Proteinexpression. Die NIPP1-Suppression bedingte keine Unterschiede in der PP1-Proteinexpression im Vergleich zu der Kontrolle. Über die Detektion von Vinculin wurde die gleichmäßige Beladung der SDS-Gele überprüft; n = 4. (C) Immuncytochemische Analyse von PP1. Die ICC zeigte ebenfalls, dass die Transfektion mit NIPP1 siRNS keinen Einfluss auf die Proteinexpression von PP1 ausübt; repräsentative Aufnahmen (Vergrößerung: 400x); n = 3, Analyse von 100 Zellen.

Die PP1-mRNS-Expression wurde mit RT PCR analysiert. Für die Untersuchung der PP1-Proteinexpression dienten Western Blots und die ICC. Die RT PCR Analysen zeigten, dass die NIPP1 siRNS Transfektion der Podozyten im Vergleich zu der Kontrolle keine signifikanten Änderungen in der PP1-mRNS-Expression induziert (**Abb. 18A**). Für die PP1-Proteinexpression konnten ebenfalls keine Unterschiede zwischen NIPP1 siRNS und co siRNS detektiert werden (**Abb. 18B** und **18C**). Wie für AGE-BSA bereits beobachtet werden konnte, verdeutlichten auch hier die immuncytochemischen Analysen eine tendenzielle Translokation von PP1 vom Zytoplasma in den Zellkern (**Abb. 18C**).

**Abb. 19:** Analyse der PP1-Phosphatase-Aktivität bei Transfektion mit NIPP1 siRNS.

Die NIPP1-Suppression bewirkte eine signifikant erhöhte Aktivität von PP1 im Vergleich zu der co siRNS Transfektion; n = 12; ***p < 0,001 versus co siRNS.

Die Aktivität der Phosphatase wurde mit dem ProFluor™ Ser/Thr Phosphatase Assay analysiert. Die Untersuchungen zeigten eine signifikant erhöhte Aktivität von PP1 bei Transfektion der Podozyten mit NIPP1 siRNS im Vergleich zu der Kontrollbehandlung (**Abb. 19**). Die Resultate hinsichtlich Expression und Aktivität von PP1 bei der Transfektion der Podozyten mit NIPP1 siRNS sind vergleichbar zu denen der AGE-BSA Behandlung und unterstreichen die Relevanz von NIPP1 als inhibierende Untereinheit der Proteinphosphatase 1 in den Podozyten.

3.4. Messung der zellulären Toxizität

Um auszuschließen, dass die durch die AGE-BSA Behandlung und die NIPP1 siRNS Transfektion der Podozyten gewonnenen Daten auf zytotoxischen Effekten beruhen, wurde die LDH-Aktivität in dem Zellkulturüberstand ermittelt. LDH ist ein zytoplasmatisches Enzym, das prinzipiell in allen Zellen vorkommt. Bei Zellschädigung wird es in das umgebende Milieu freigesetzt. Die gemessene LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand ist daher ein ungefährer Anhaltspunkt für die Zytotoxizität. Als Positivkontrolle dienten mit 1% Triton X-100 behandelte Zellen und als Negativkontrolle mit 10% FKS inkubierte Zellen.

Wie in **Abbildung 20** dargestellt ist, waren weder Co-BSA bzw. AGE-BSA, noch die Transfektion mit co siRNS bzw. NIPP1 siRNS zytotoxisch für die Podozyten. Die gemessene LDH-Aktivität entsprach für alle vier zu testenden Behandlungen dem gemessenen Wert für die 10% FKS Inkubation. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen mit Triton X-100 behandelt, welches die Zellmembran permeabilisiert und dadurch die Freisetzung zytoplasmatischer Bestandteile induziert. Die für die 1% Triton X-100 Behandlung erhaltenen Resultate waren signifikant um ein Vielfaches erhöht.

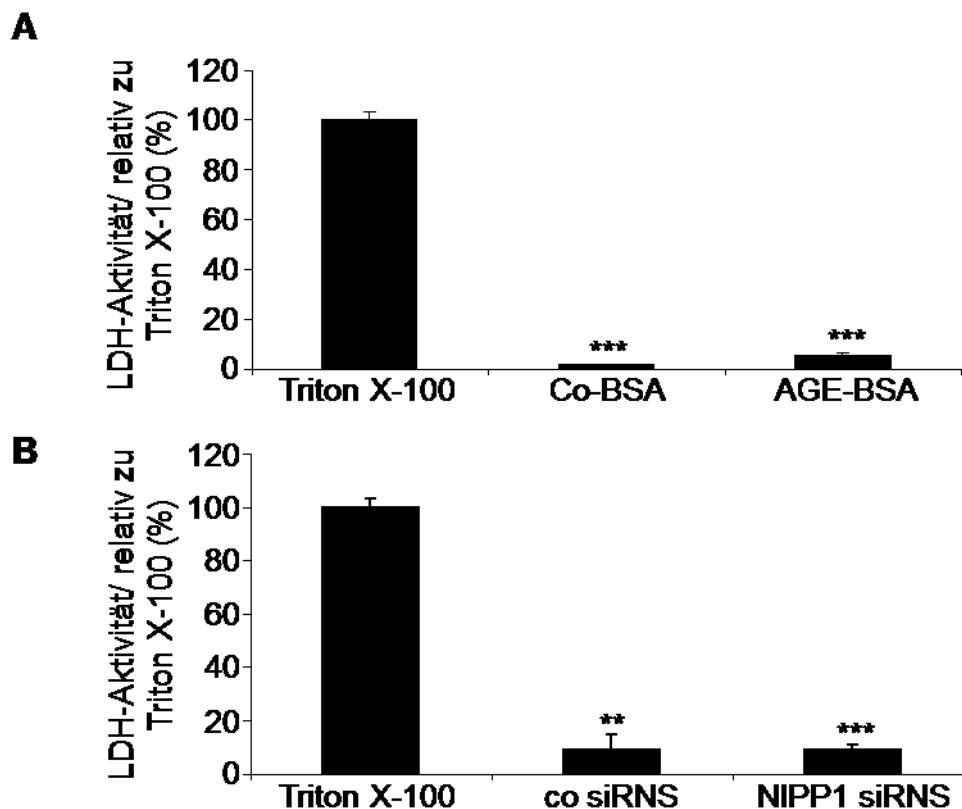


Abb. 20: Analyse der LDH-Aktivität.

(A) Analyse der Zytotoxizität von Co-BSA und AGE-BSA auf die Podozyten. Die Untersuchungen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Co-BSA und AGE-BSA, jedoch eine signifikante Differenz zu der Positivkontrolle; $n = 8$; *** $p < 0,001$ versus Triton X-100. (B) Analyse der Zytotoxizität der Transfektion mit siRNS. Für die Transfektion der Podozyten mit NIPP1 siRNS und co siRNS konnte im Vergleich zu der Positivkontrolle keine LDH-Aktivität beobachtet werden; $n = 8$; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ versus Triton X-100.

3.5. Einfluss der NIPP1-Suppression auf pathophysiologische Vorgänge in den Podozyten

Eine Arbeit von Rüster *et al.* [154] zeigte, dass AGE-BSA eine verminderte Proliferationsrate, eine zelluläre Hypertrophie und einen Arrest in der G_0/G_1 -Phase des Zellzyklus in Podozyten induziert. Hingegen konnten keine apoptotischen Effekte von AGE-BSA auf die Podozyten nachgewiesen werden. Auf Grundlage dieser Vorbefunde sollte die funktionelle Bedeutung von NIPP1 in diesen Prozessen analysiert werden. Als Anhaltspunkt für das Verhalten der Podozyten bei Inkubation

mit AGE-BSA dienten jeweils eigene Analysen.

3.5.1. Relevanz der NIPP1-Suppression für die zelluläre Proliferation

Es wurde die BrdU-Inkorporation bei Transfektion der Podozyten mit NIPP1 siRNS analysiert. Wie **Abbildung 21B** zeigt, war die Proliferationsrate in den mit NIPP1 siRNS transfizierten Podozyten 24 h und 48 h nach Behandlung signifikant geringer als bei den entsprechenden Kontrollzellen. Nach 72 h war eine wieder gesteigerte Proliferationsrate zu verzeichnen, da wie bereits erwähnt wurde, die Transfektion nicht über 72 h stabil war. Es wurde zudem die Proliferation von mit AGE-BSA inkubierten Podozyten analysiert. Die Daten belegten eine signifikant verminderte Proliferationsrate bei Behandlung der Zellen mit AGE-BSA für 24 h und 48 h im Vergleich zu Co-BSA (**Abb. 21A**). Die Untersuchungen bestätigen diesbezüglich die Resultate von Rüster *et al.* [154]. Nach 72 h Inkubation mit AGE-BSA war keine Analyse mehr möglich, da sich die Zellen bereits nach 48 h begannen vom Untergrund zu lösen.

Die Wirkung der NIPP1-Suppression auf die Proliferationsrate der Zellen wurde parallel mit dem CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay über die Messung der Zellzahl ermittelt. Dabei wurde die Absorption von Formazan detektiert, das in vitalen Zellen aus der Reduktion von MTS entsteht. Für alle Behandlungen wurde initial eine konstante Zellzahl eingesetzt.

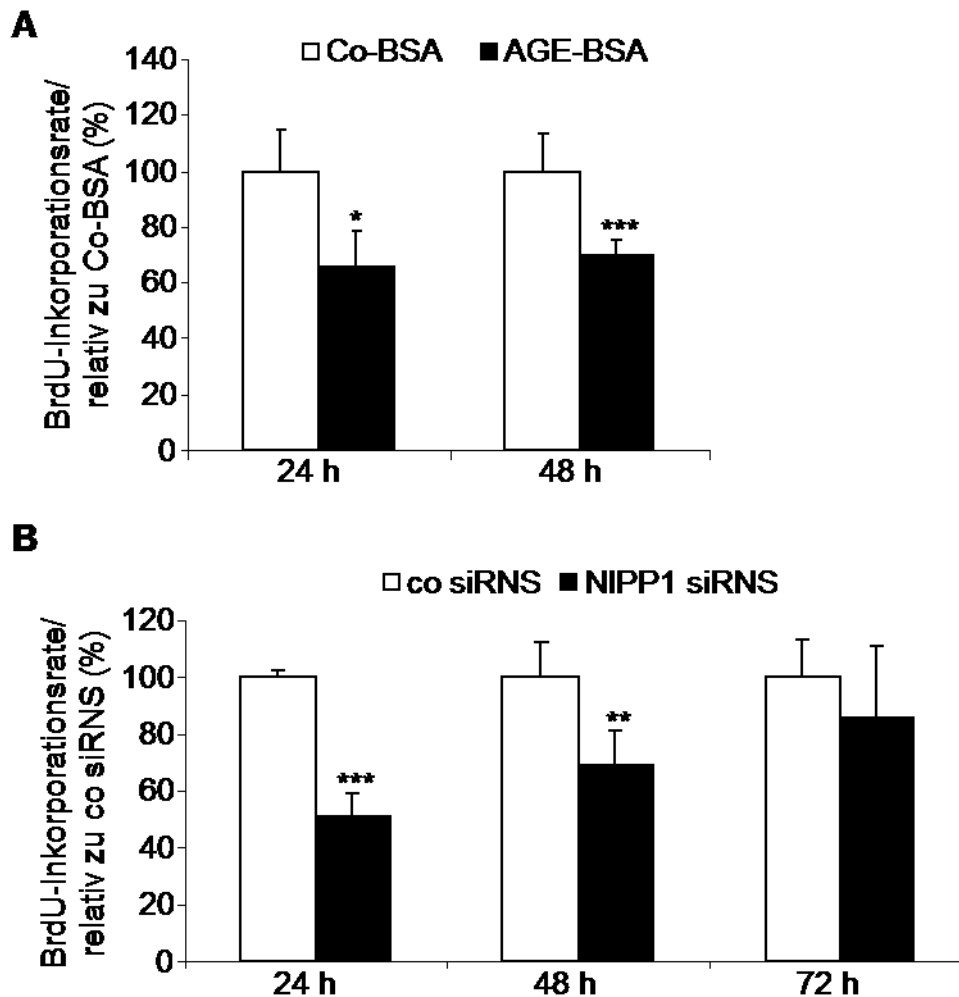


Abb. 21: Analyse der BrdU-Inkorporationsrate in die DNS der Podozyten.

(A) Messung der Proliferationsrate AGE-BSA behandelter Podozyten. Die Untersuchungen zeigten eine signifikant reduzierte Proliferation der Podozyten nach 24 h und 48 h Inkubation mit AGE-BSA im Vergleich zu der Kontrollbehandlung; $n = 9$; *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ versus Co-BSA. (B) Analyse der BrdU-Inkorporation bei Transfektion der Podozyten mit NIPP1 siRNS. Nach 24 h und 48 h Inkubation konnte eine signifikant verminderte Proliferation bei NIPP1-Suppression detektiert werden, die 72 h nach Transfektion nicht mehr gemessen werden konnte; $n = 9$; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ versus co siRNS.

Die Analysen zeigten eine signifikant geringere Zellzahl bei den mit NIPP1 siRNS transfizierten Podozyten im Vergleich zu der Kontrolle, sowohl für die 24- als auch 48-stündige Inkubation. Aufgrund der nur transienten Wirkung der NIPP1-Suppression konnte nach 72 h keine signifikante Differenz mehr zwischen der NIPP1 siRNS Transfektion und der Kontrolle beobachtet werden (**Abb. 22B**). Auch für die

Behandlung mit AGE-BSA konnte im Vergleich zu den mit Co-BSA behandelten Zellen nach 24 h und 48 h Inkubation eine signifikant verminderte Zellzahl ermittelt werden (**Abb. 22A**).

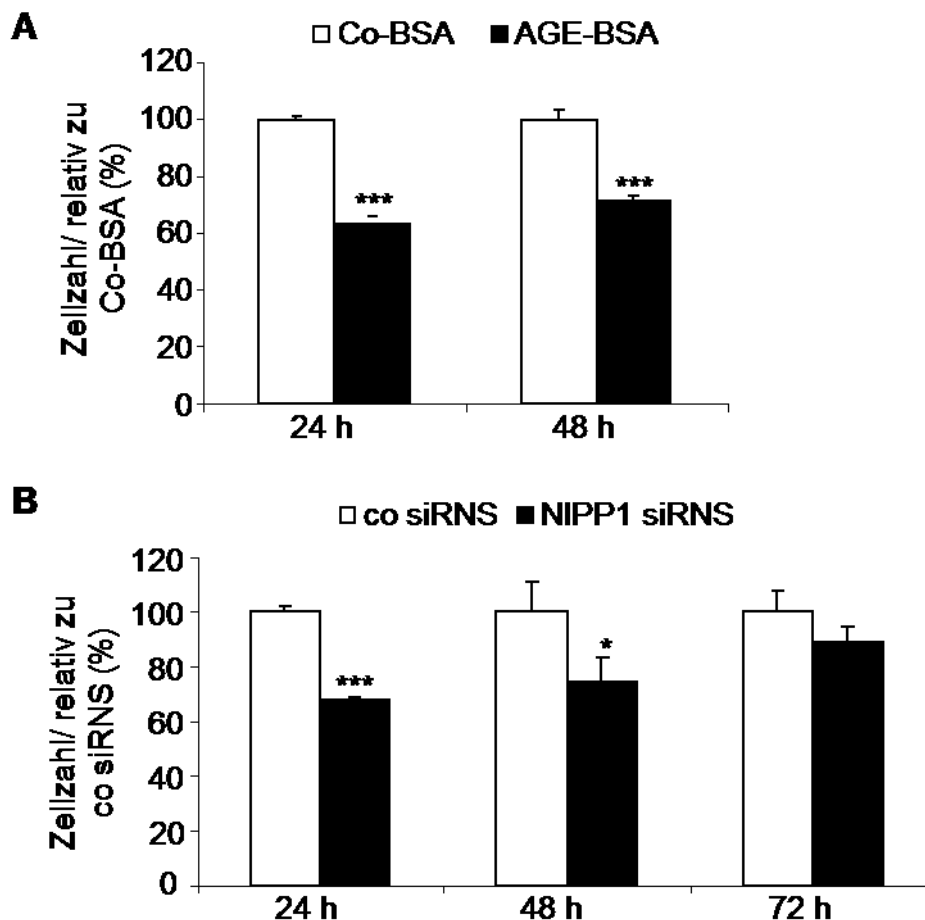


Abb. 22: Beurteilung der zellulären Proliferationsrate über die Analyse der Zellzahl.

(A) Ermittlung der Zellzahl bei Inkubation der Podozyten mit AGE-BSA. Die Behandlung mit AGE-BSA für 24 h und 48 h verursachte eine signifikant verminderte Zellzahl im Vergleich zu der Kontrolle; $n = 9$; *** $p < 0,001$ versus Co-BSA. (B) Bestimmung der Zellzahl nach siRNS Transfektion. Die durch NIPP1 siRNS Transfektion induzierte NIPP1-Suppression bewirkte eine signifikant geringere Zellzahl im Vergleich zu co siRNS 24 h und 48 h nach Inkubation. Für die 72-stündige Inkubation der Podozyten konnten keine signifikanten Abweichungen beobachtet werden; $n = 9$; *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ versus co siRNS.

Mit beiden Assays konnte eine verminderte Proliferation der Podozyten bei Suppression von NIPP1, sowohl durch die Behandlung mit AGE-BSA als auch durch die Transfektion der Zellen mit NIPP1 siRNS gezeigt werden.

3.5.2. Stellenwert der verminderten NIPP1-Expression bei der zellulären Hypertrophie

Ein Merkmal AGE-BSA behandelter Podozyten ist eine zelluläre Hypertrophie [154]. Es wurde untersucht, ob dieses Phänomen auch durch eine NIPP1-Suppression vermittelt wird. Dazu wurde die Zellgröße einzeln stehender Zellen ermittelt und der Proteingehalt einer definierten Anzahl an Zellen bestimmt. Grundlage der Analysen war die Behandlung der Podozyten mit AGE-BSA bzw. die Transfektion mit NIPP1 siRNS.

Zunächst wurde die Zellgröße einzeln stehender Podozyten lichtmikroskopisch ermittelt. Die Untersuchungen zeigten einen signifikant vergrößerten Zellumfang NIPP1 siRNS transfizierter Podozyten im Vergleich zu der Transfektion mit co siRNS (**Abb. 23A**). Für die Analyse des Proteingehalts wurde die Zellzahl nach dem Ablauf der 24 h bestimmt und die Proteinkonzentration ermittelt. Der Proteingehalt, kalkuliert für 10^3 Zellen, belegte eine signifikant höhere Proteinexpression in den mit NIPP1 siRNS transfizierten Podozyten im Vergleich zu der Kontrollbehandlung. Fasst man die Daten beider Untersuchungen zusammen ist festzustellen, dass die NIPP1-Suppression eine zelluläre Hypertrophie bedingt (**Abb. 23B**).

Es wurde zudem die Hypertrophie von mit AGE-BSA behandelten Podozyten analysiert. Die Untersuchungen zeigten einen signifikant vergrößerten Zellumfang und eine signifikant erhöhte Proteinkonzentration pro 10^3 Zellen im Vergleich zu den mit Co-BSA inkubierten Podozyten (**Abb. 23**). Diese Resultate bestätigen die von Rüster *et al.* [154] publizierten Daten einer durch AGE-BSA induzierten, podozytären Hypertrophie. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die verminderte NIPP1-Expression eine entscheidende Rolle in diesem Prozess spielen könnte.

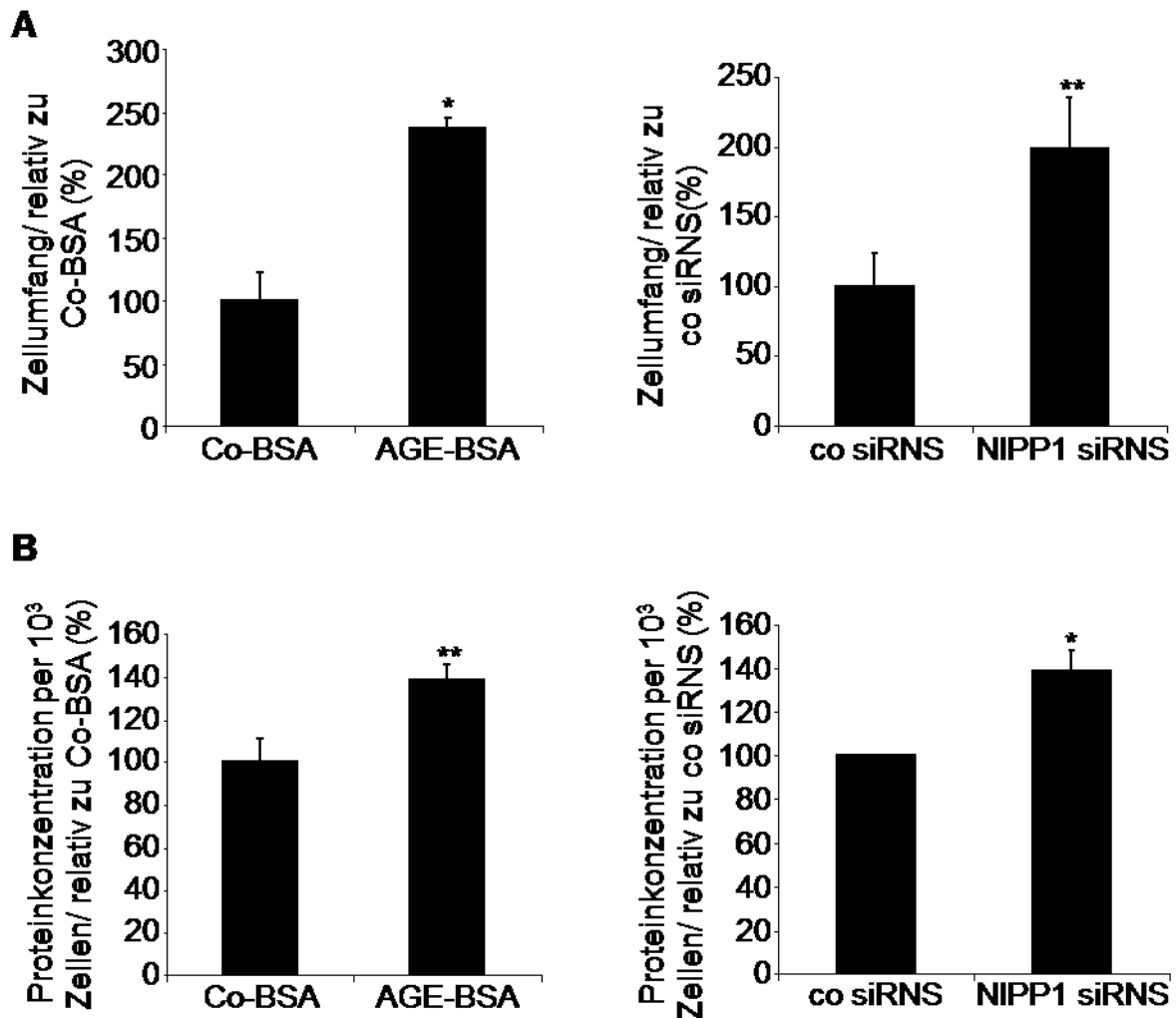


Abb. 23: Messung der zellulären Hypertrophie.

(A) Analyse des Zellumfangs einzeln stehender Zellen. Die Untersuchungen zeigten eine signifikante Zunahme der Zellgröße (gemessen als Zellumfang) sowohl bei Behandlung mit AGE-BSA als auch bei Transfektion der Podozyten mit NIPP1 siRNS im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollbehandlung; $n = 6$, Analyse von 200 Zellen; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ versus co siRNS bzw. Co-BSA. (B) Analyse des Proteingehalts von 10³ entsprechend behandelten Podozyten. Die Resultate belegten für die AGE-BSA Behandlung und NIPP1 siRNS Transfektion eine zelluläre Hypertrophie; $n = 9$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus co siRNS bzw. Co-BSA.

3.5.3. Bedeutung der NIPP1-Suppression für das Zellzyklus-geschehen in den Podozyten

Die Inkubation der Podozyten mit AGE-BSA induziert eine signifikant gesteigerte Expression von p27^{Kip1} und in Verbindung damit einen Arrest in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus [154]. Das Zellzyklusprotein p27^{Kip1} ist ein Marker für einen Verbleib der Zellen in der G₀/G₁-Phase, der letztendlich zur Hypertrophie führt. Eine erhöhte p27^{Kip1}-Proteinexpression verhindert die G₁/S-Transition [2, 155].

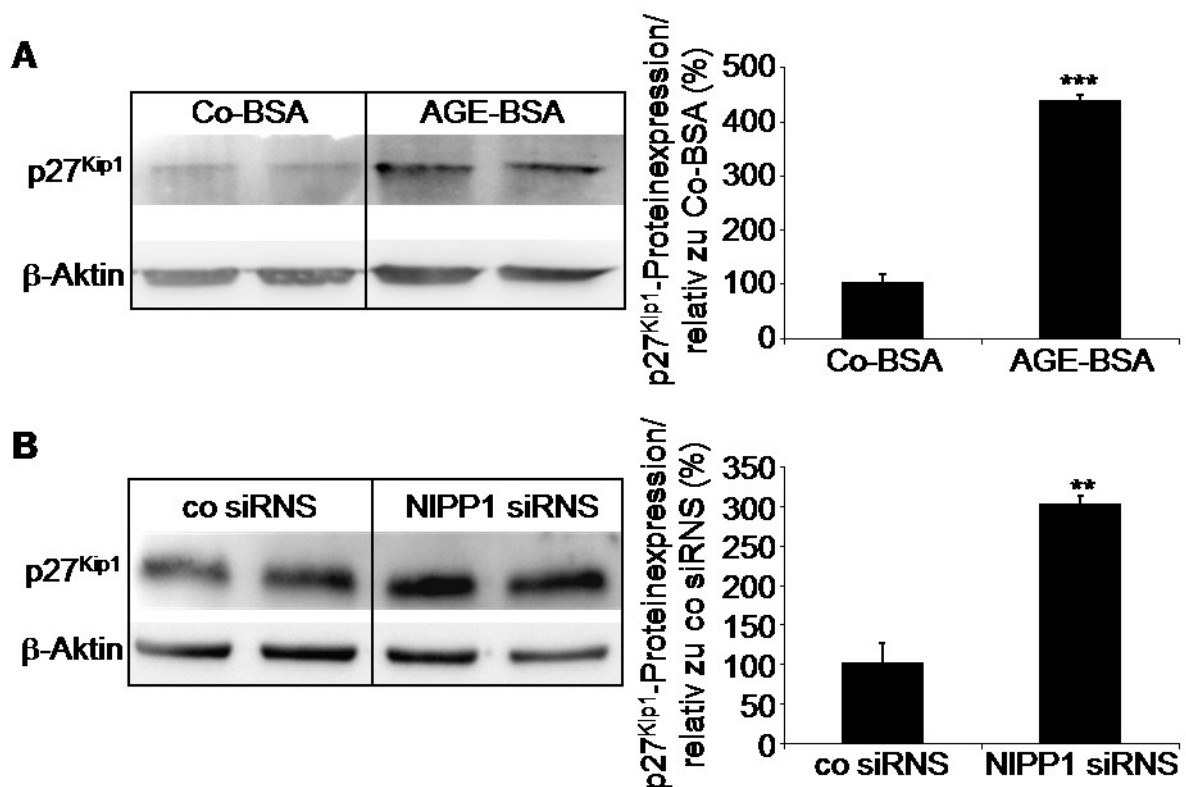


Abb. 24: Proteinexpression des Zellzyklusmarkers p27^{Kip1}.

(A) Western Blot Analyse der p27^{Kip1}-Proteinexpression (27 kDa) bei AGE-BSA Behandlung. Die Western Blots zeigten eine signifikant erhöhte p27^{Kip1}-Proteinexpression bei Behandlung der Podozyten mit AGE-BSA; repräsentativer Western Blot; n = 9; ***p<0,001 versus Co-BSA. (B) Analyse von p27^{Kip1} in mit NIPP1 siRNS transfizierten Podozyten. Mit dem Western Blot konnte eine signifikant erhöhte p27^{Kip1}-Expression bei Transfektion mit NIPP1 siRNS im Vergleich zu co siRNS detektiert werden; n = 9; **p<0,01 versus co siRNS. Die gleichmäßige Proteinbeladung der SDS-Gele wurde für alle Behandlungen über die Detektion von β-Aktin überprüft.

Durch Transfektion der Podozyten mit NIPP1 siRNS sollte analysiert werden, ob die detektierte NIPP1-Suppression nach Behandlung der Podozyten mit AGE-BSA mitentscheidend für den beobachteten Zellzyklusarrest ist. Dafür wurde durch Western Blot Analysen die p27^{Kip1}-Proteinexpression in NIPP1 siRNS transfizierten Podozyten untersucht. Wie die **Abbildung 24B** belegt, war bei Transfektion mit NIPP1 siRNS eine signifikant erhöhte p27^{Kip1}-Expression in den Podozyten im Vergleich zu den mit co siRNS transfizierten Zellen zu detektieren. Die Untersuchung von p27^{Kip1} in mit AGE-BSA behandelten Podozyten zeigte eine ebenfalls signifikant erhöhte p27^{Kip1}-Proteinexpression im Vergleich zu der Co-BSA Inkubation (**Abb. 24A**).

Die Beobachtung, dass die gesteigerte Expression von p27^{Kip1} durch die NIPP1-Suppression verursacht wird, legte eine weitere Untersuchung des Zellzyklusverhaltens von mit NIPP1 siRNS transfizierten Podozyten nahe. Für die Zellzyklusanalyse wurde der DNS-Gehalt über die Markierung der Podozyten mit Propidiumjodid im FACS ermittelt und der prozentuale Anteil der Zellpopulation für jede Phase des Zellzyklus bestimmt. Dazu wurden die FACS-Daten mit der WinMDI 2.9 Software analysiert und die einzelnen Phasen des Zellzyklus markiert.

Es wurde das Zellzyklusverhalten der Podozyten bei einer 24-stündigen Behandlung mit AGE-BSA untersucht. Für die Behandlung der Zellen mit AGE-BSA konnte im Vergleich zu der Kontrollbehandlung mit Co-BSA ein Arrest der Zellen in der G₀/G₁-Phase beobachtet werden (**Abb. 25A**). Die Analyse der mit NIPP1 siRNS transfizierten Podozyten zeigte, dass im Vergleich zu der Kontrolltransfektion mit co siRNS, eine signifikant höhere Anzahl an Podozyten in der G₀/G₁-Phase verharrte, sowohl für die 24- als auch die 48-stündige Inkubation der Zellen (**Abb. 25B**).

Diese Resultate unterstreichen die Bedeutung der NIPP1-Suppression für die bei der AGE-BSA Behandlung beobachtete Induktion eines Zellzyklusarrests in der G₀/G₁-Phase.

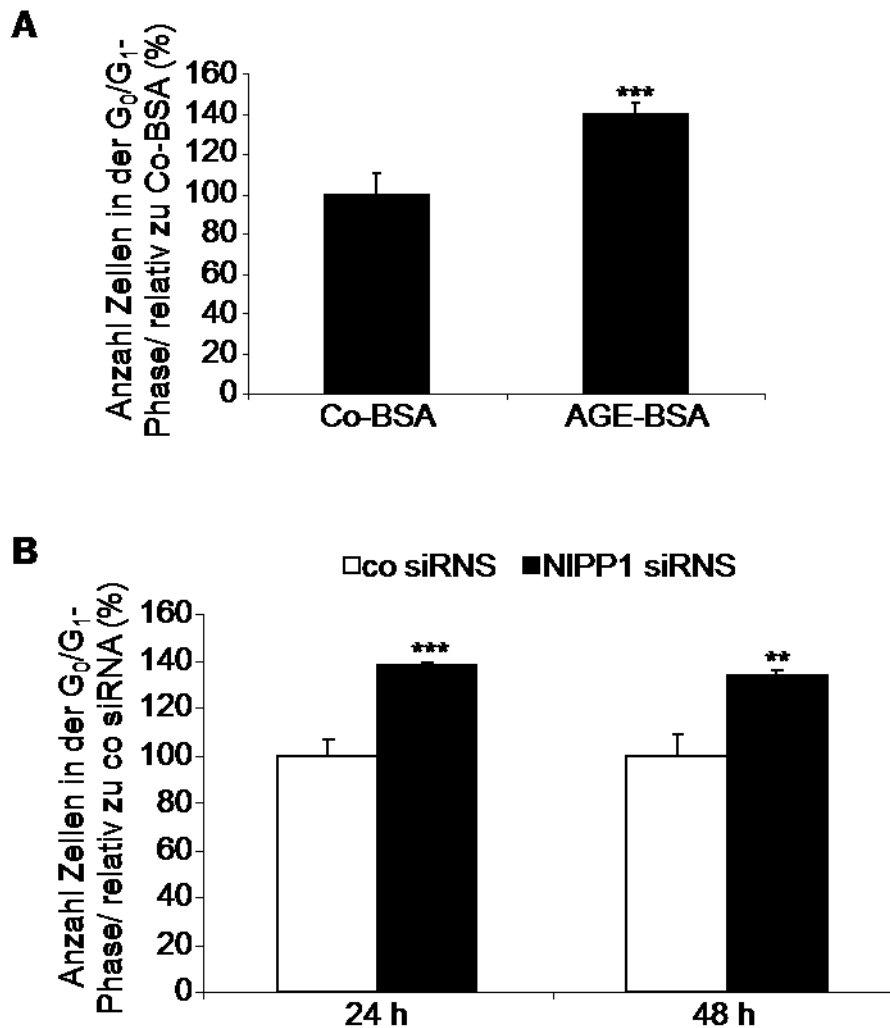


Abb. 25: Analyse des Zellzyklusverhaltens der Podozyten mit dem FACS.

(A) Zellzyklusanalyse von mit AGE-BSA behandelten Podozyten. Die Daten zeigten einen Verbleib der Zellen in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus bei Inkubation der Podozyten mit AGE-BSA für 24 h verglichen mit der Co-BSA Behandlung; n = 8; ***p<0,001 *versus* Co-BSA. (B) Zellzyklusanalyse bei Transfektion der Zellen mit NIPP1 siRNS. Die Transfektion induzierte einen Zellzyklusarrest in der G₀/G₁-Phase 24 h und 48 h nach Behandlung im Vergleich zu co siRNS; n = 8; ***p<0,001, **p<0,01 *versus* co siRNS.

3.5.4. Analyse der Podozyten auf Apoptose bei Suppression von NIPP1

Die diabetische Niere ist durch einen Verlust an Podozyten gekennzeichnet [58]. *In vitro* Versuche zeigten allerdings, dass AGE-BSA keine direkte Apoptose in den

Podozyten induziert [154]. Es sollte nun die Frage beantwortet werden, ob eine Suppression von NIPP1 durch siRNS Transfektion möglicherweise apoptotische Vorgänge in den Podozyten auslösen kann.

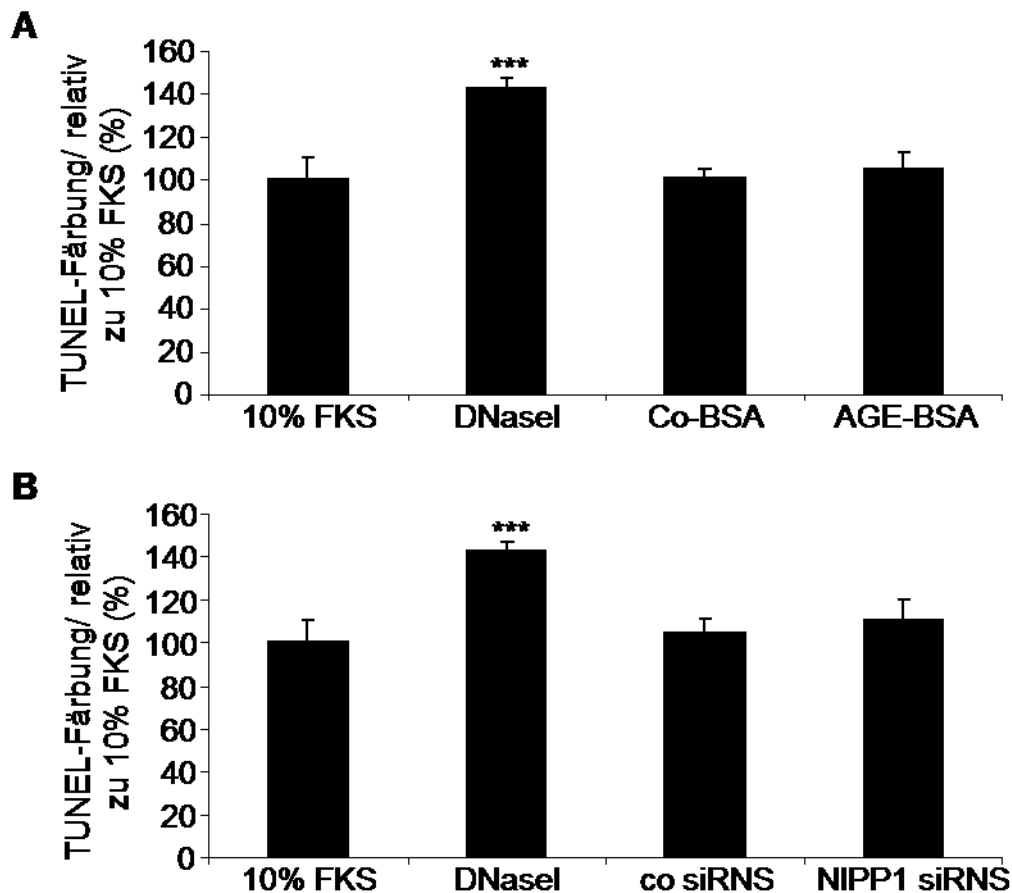


Abb. 26: Messung von Apoptose mit dem TUNEL Assay.

A) Analyse AGE-BSA behandelter Podozyten. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit Co-BSA bzw. den mit AGE-BSA behandelten Podozyten und der 10% FKS Inkubation detektiert werden, hingegen ein signifikanter Unterschied für die Behandlung mit DNaseI zu 10% FKS; Analyse von 200 Zellen; $n = 6$; *** $p < 0,001$ *versus* 10% FKS. **(B)** Untersuchung von mit NIPP1 siRNS transfizierten Podozyten. Die Transfektion mit NIPP1 siRNS bzw. co siRNS induzierte keine Apoptose in den Podozyten verglichen mit der Positivkontrolle; Analyse von 200 Zellen; $n = 6$; *** $p < 0,001$ *versus* 10% FKS.

Für die Analyse von Apoptose diene einerseits der *In situ cell death detection* Assay (TUNEL Technologie), mit welchem Bruchstücke von genomischer DNS detektiert werden können, die bei der Induktion des programmierten Zelltods durch eine erhöhte Aktivität von Endonukleasen entstehen. Zusätzlich wurde der Annexin-V Assay genutzt, der eine Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose ermöglicht.

Zunächst wurden NIPP1 siRNS transfizierte Podozyten mit dem TUNEL Assays auf apoptotische Prozesse untersucht. Hierbei wurde die Intensität der Färbung mit der AxioVision Rel. 4.6. Software ermittelt. Wie die **Abbildung 26B** zeigt, induzierte die Transfektion der Podozyten mit NIPP1 siRNS und co siRNS verglichen zu der Inkubation mit 10% FKS (Negativkontrolle) keine Apoptose in den Zellen, im Gegensatz zu der Positivkontrolle (DNaseI).

Für die Behandlung der Podozyten mit AGE-BSA konnte mit dem TUNEL Assay ebenfalls keine Apoptose detektiert werden. Die Auswertung zeigte keine signifikanten Differenzen zwischen 10% FKS, Co-BSA und AGE-BSA, aber deutliche Abweichungen zu der Positivkontrolle (**Abb. 26A**). Die Intensität der Färbung der Negativkontrolle wurde willkürlich als 100% festgelegt, was aber nicht mit einer vollständigen apoptotischen Aktivität in den Zellen gleichzusetzen ist.

Annexin-V detektiert Phosphatidylserin, welches bei apoptotischen und nekrotischen Prozessen von der Innenseite der Zellmembran auf die Außenseite transloziert. Für die Differenzierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen ist der Suspension der DNS-bindende Farbstoff Propidiumjodid beigefügt, der intakte Zellen nicht passieren kann und als Marker für die Nekrose gilt. Nach der Analyse mit dem FACS wurden die Daten mit der WinMDI 2.9 Software ausgewertet und die Signale für die PI- und Annexin-V-Färbung im DotPlot gegenübergestellt. Durch Setzen von Quadranten wurden vitale Zellen von apoptotischen und nekrotischen Zellen abgegrenzt und der prozentuale Anteil jeder Zellpopulation ermittelt.

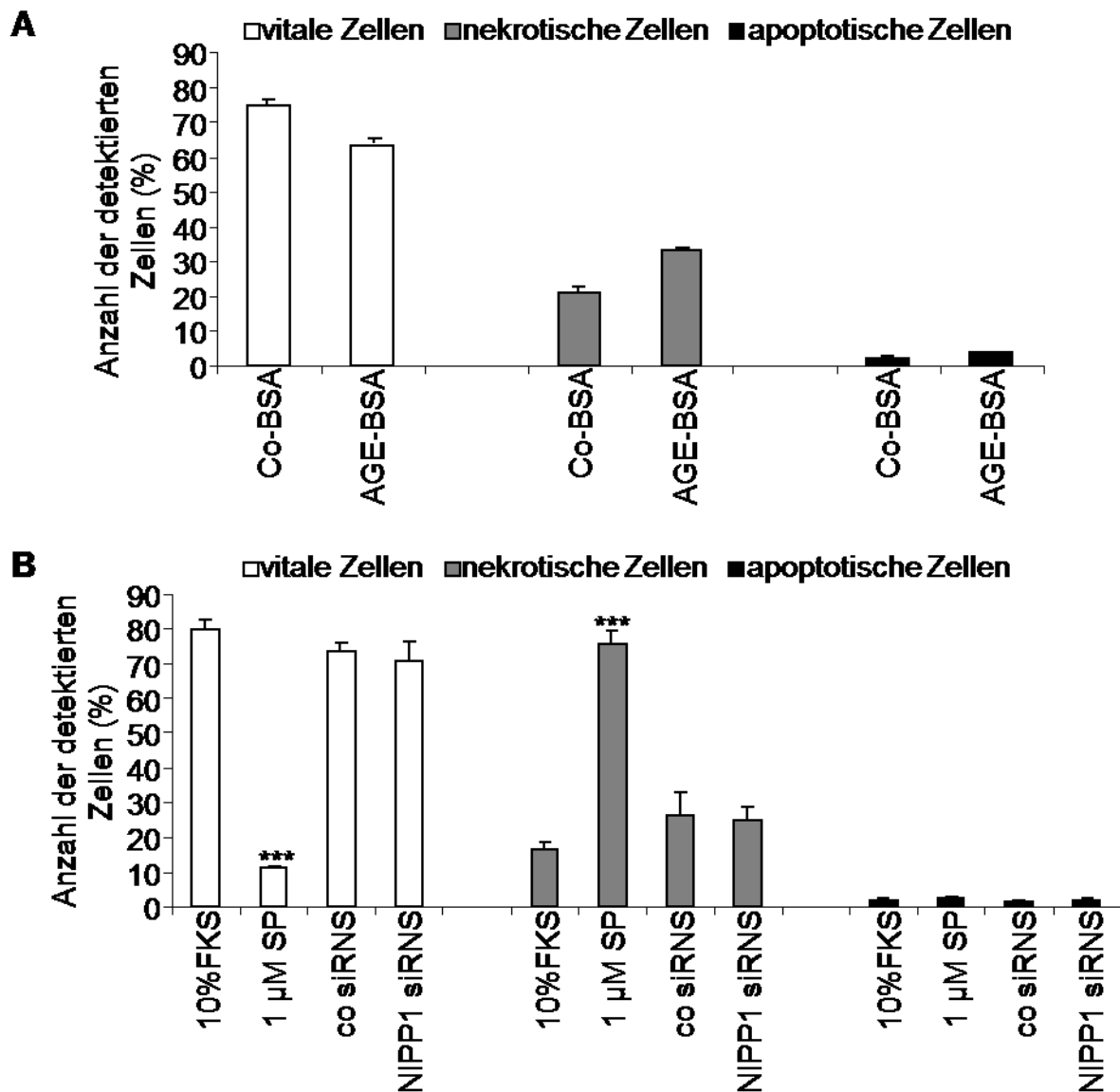


Abb. 27: Messung von Apoptose und Nekrose mit dem Annexin-V Assay mithilfe des FACS.

(A) Analyse von AGE-BSA behandelten Podozyten mit dem Annexin-V Assay. Die Behandlung der Zellen mit AGE-BSA verursachte keine Apoptose, aber tendenziell eine nicht signifikant erhöhte Anzahl von nekrotischen Zellen nach Inkubation mit AGE-BSA im Vergleich zu Co-BSA; $n = 12$. (B) Analyse von mit NIPP1 siRNS transfizierten Podozyten. Die Abbildung zeigt, dass die Transfektion mit NIPP1 siRNS und mit co siRNS keine Apoptose in den Zellen induzierte. Die Messung der vitalen und nekrotischen Zellen belegte eine signifikante Differenz für die co siRNS bzw. NIPP1 siRNS Transfektion zu der Inkubation der Podozyten mit 1 µM Staurosporin; $n = 12$; $***p < 0,001$ versus 1 µM Staurosporin. SP = Staurosporin.

Die Auswertungen zeigten, dass sowohl die Transfektion der Podozyten mit co siRNS als auch mit NIPP1 siRNS keine Apoptose in den Zellen induziert. Die **Abbildung 27B** dokumentiert, dass die Transfektion allein auf die Podozyten schon leicht nekrotisch wirkte. Die Differenz der Anzahl nekrotischer Zellen zu der für die 10% FKS Behandlung detektierten Zellzahl war aber nicht signifikant, im Gegensatz zu der Inkubation der Podozyten mit 1 μ M Staurosporin. Die Behandlung der Zellen mit 1 μ M Staurosporin für die Positivkontrolle war zu lang, weshalb keine Apoptose, sondern Nekrose mit dem FACS detektiert wurde (**Abb. 27B**).

Auch hier wurden Analysen hinsichtlich apoptotischer Charakteristika in mit AGE-BSA behandelten Podozyten durchgeführt. Die Resultate des TUNEL Assays (**Abb. 26A**) und des Annexin-V Assays (**Abb. 27A**) zeigten keine Apoptose bei Behandlung der Podozyten mit Co-BSA bzw. mit AGE-BSA. Aber die Messung mit dem FACS dokumentierte, dass AGE-BSA im Vergleich zu Co-BSA auf die Zellen tendenziell eher nekrotisch wirkt (**Abb. 27A**). Diese Ergebnisse bestätigen die bereits publizierten Daten von Rüster *et al.* [154].

3.6. Rolle von RAGE bei der Suppression von NIPP1

RAGE, einer der Rezeptoren für AGEs, ist *in vivo* unter diabetischen Konditionen in den Podozyten hochreguliert [28, 41]. Deshalb sollte überprüft werden, ob die für die Behandlung mit AGE-BSA beobachtete verminderte NIPP1-Expression durch Aktivierung des RAGE-Signalwegs bedingt wird. Die Blockade des Rezeptors für AGEs (RAGE) mit einem murinen RAGE-Antikörper könnte zeigen, ob die beobachteten Effekte der AGE-BSA Behandlung bezüglich der verminderten NIPP1-Expression reversibel sind. Die Zellen wurden deshalb vor und während der Behandlung mit AGE-BSA mit dem Antikörper inkubiert um die freien Ligandenbindstellen des Rezeptors zu blockieren. Die RT PCR Analyse zeigte, dass die parallele Inkubation der Podozyten mit dem RAGE-Antikörper und mit AGE-BSA die AGE-BSA-induzierte NIPP1-Suppression aufhebt, da die NIPP1-mRNS-Expression den für Co-BSA gemessenen Wert entsprach (**Abb. 28**).

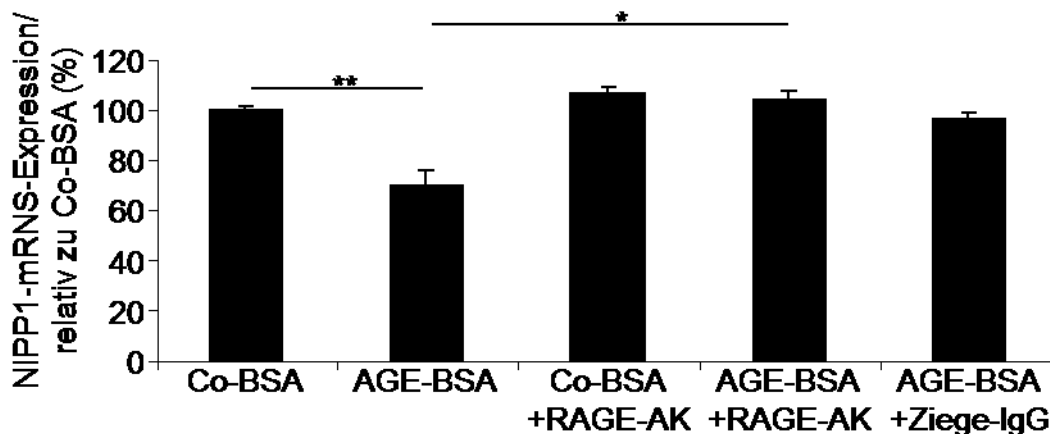


Abb. 28: Blockade von RAGE über einen murinen RAGE-Antikörper.

Die Analyse durch RT PCR zeigte eine NIPP1-Suppression bei Inkubation mit AGE-BSA, verglichen mit Co-BSA, die durch die parallele Behandlung der Podozyten mit AGE-BSA und dem RAGE-Antikörper aufgehoben wurde. Für Co-BSA und den RAGE-Antikörper bzw. AGE-BSA und Ziege-IgG (als nicht immunogene Antikörper-Kontrolle) konnten keine signifikanten Unterschiede zu der Inkubation mit Co-BSA detektiert werden; $n = 12$; $**p < 0,01$, $*p < 0,05$ versus Co-BSA bzw. AGE-BSA. AK = Antikörper; IgG = Immunglobulin G.

Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte aus der Immunglobulinstruktur resultieren, sondern auf die spezifische Blockierung zurückzuführen sind, wurde eine simultane Behandlung der Zellen mit Co-BSA und dem RAGE-Antikörper bzw. AGE-BSA und Ziege-IgG als Isotypen-Kontrolle mitgeführt. Die Analysen zeigten keine signifikanten Differenzen in der NIPP1-mRNS-Expression (**Abb. 28**). Die Resultate weisen daher auf eine Beteiligung des AGE/RAGE-vermittelten Signalwegs an der NIPP1-Suppression hin.

3.7. Einfluss der NIPP1-Suppression auf RAGE-Signaltransduktionsprozesse in Podozyten

Eine permanente Stimulation von RAGE aufgrund einer chronisch hohen AGE-Belastung aktiviert den Transkriptionsfaktors $\text{NF}\kappa\text{B}$, der die Transkription einer Vielzahl inflammatorischer Gene wie $\text{TNF}\alpha$ und die von RAGE selbst regulieren kann [46, 50]. Die so induzierte positive Rückkopplung resultiert in einer progressiven

Zunahme der RAGE- und NF κ B-Expression [2, 46]. In immuncytochemischen Analysen wurde untersucht, ob die RAGE-Proteinexpression in den Podozyten nach Behandlung mit AGE-BSA erhöht ist und ob die Suppression von NIPP1 dafür maßgebend ist.

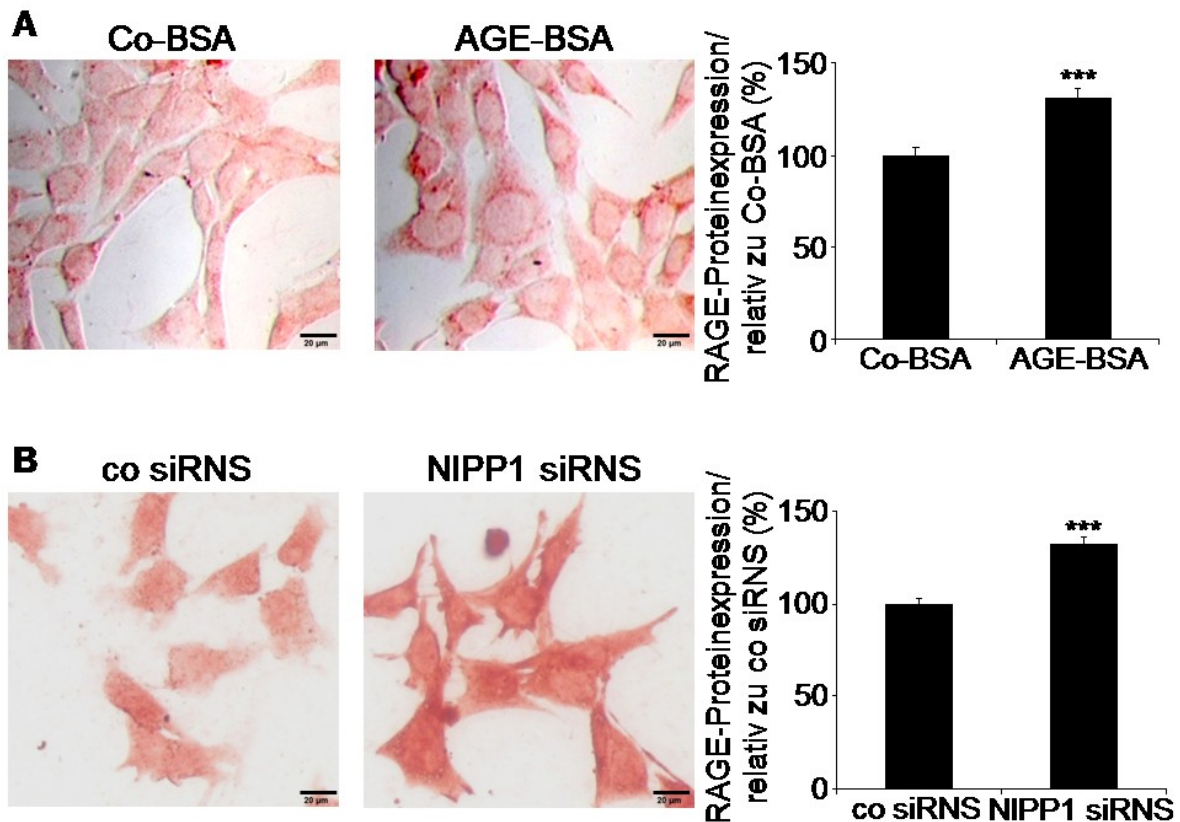


Abb. 29: Immuncytochemische Untersuchung der RAGE-Proteinexpression.

(A) RAGE-Expression bei Behandlung der Podozyten mit AGE-BSA. Die Daten zeigten eine signifikant erhöhte RAGE-Proteinexpression in den mit AGE-BSA behandelten Podozyten; repräsentative Aufnahmen (Vergrößerung: 400x); n = 4, Analyse von 200 Zellen; ***p<0,001 versus Co-BSA. (B) RAGE-Proteinexpression in mit NIPP1 siRNS transfizierten Podozyten. Die Transfektion mit NIPP1 siRNS induzierte eine signifikant erhöhte RAGE-Expression; repräsentative Aufnahmen (Vergrößerung: 400x); n = 4, Analyse von 200 Zellen; ***p<0,001 versus co siRNS.

Die Untersuchungen für AGE-BSA zeigten eine signifikant erhöhte RAGE-Expression im Vergleich zu den mit Co-BSA behandelten Zellen (**Abb. 29A**). Die immunocytochemische Analyse von RAGE in mit NIPP1 siRNS transfizierten Podozyten dokumentierte ein ebenfalls signifikant gesteigerte Proteinexpression im Vergleich zu der co siRNS Transfektion (**Abb. 29B**) und impliziert damit eine Beteiligung der NIPP1-Suppression an diesem Prozess.

Es wurde untersucht, ob diese erhöhte RAGE-Expression mit einer gesteigerten Aktivität von NF κ B einhergeht. Weiterhin wurde die mRNS-Expression des von diesem regulierten Gens für TNF α analysiert. Die Daten zeigten, dass bei Behandlung der Zellen mit AGE-BSA nach 24 h keine signifikante Differenz in der NF κ B-Aktivität im Vergleich zu der Inkubation mit Co-BSA detektiert werden konnte (**Abb. 30A**). Für die Analyse bei NIPP1 siRNS Transfektion wurden die Zellen mit NIPP1 siRNS und dem Luciferase-Reporterplasmid pNF κ B-Luc kotransfiziert. Die Resultate belegten eine signifikant gesteigerte Luciferase-Aktivität in den mit NIPP1 siRNS und pNF κ B-Luc kotransfizierten Podozyten im Vergleich zu der Kotransfektion mit co siRNS (**Abb. 30B**) und demzufolge eine signifikant erhöhte NF κ B-Aktivität.

Die Analyse der mRNS-Expression von TNF α in mit NIPP1 siRNS transfizierten Podozyten durch RT PCR zeigte eine signifikant gesteigerte TNF α -mRNS-Expression im Vergleich zu der co siRNS Transfektion (**Abb. 30C**).

Die Daten dokumentieren eine Rolle der NIPP1-Suppression bei der durch die Behandlung der Podozyten mit AGE-BSA induzierten vermehrten RAGE-Proteinexpression und im Zusammenhang damit dem RAGE-vermittelten, in der Aktivierung von NF κ B mündenden Signalweg.

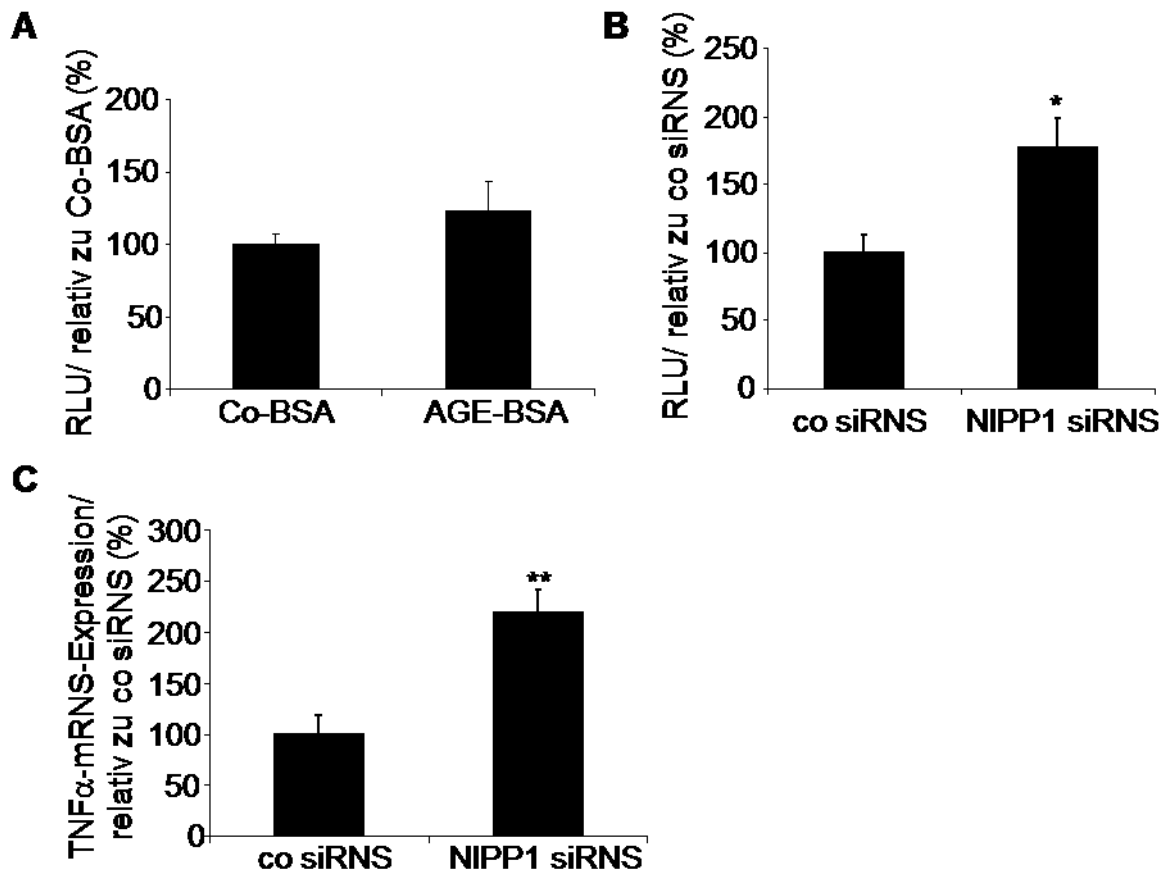


Abb. 30: Analyse der transkriptionellen Aktivität von NF κ B.

(A) Analyse der NF κ B-Aktivität bei Inkubation der Podozyten mit AGE-BSA. Für die AGE-BSA behandelten Zellen konnte nach 24 h Inkubation keine Differenz zu Co-BSA detektiert werden; $n = 10$. RLU = *relative light unit*. (B) Analyse der transkriptionellen Aktivität von NF κ B in mit NIPP1 siRNS transfizierten Zellen. Die Kotransfektion der Podozyten mit pNF κ B-Luc und NIPP1 siRNS induzierte eine signifikant gesteigerte Aktivität von NF κ B im Vergleich zu der Kotransfektion mit co siRNS; $n = 10$; * $p < 0,05$ versus co siRNS. RLU = *relative light unit*. (C) RT PCR der TNF α -mRNS-Expression. Die Untersuchungen zeigten eine signifikant erhöhte TNF α -mRNS-Expression bei Transfektion der Podozyten mit NIPP1 siRNS im Vergleich zu co siRNS; $n = 8$; ** $p < 0,01$ versus co siRNS.

3.8. Analyse der NIPP1-Proteinexpression in den Podozyten von diabetischen Mäusen

Ein wichtiger Aspekt war zu analysieren, ob die *in vitro* beobachtete NIPP1-Suppression in mit AGE-BSA behandelten Podozyten auch eine pathophysiologische

Relevanz *in vivo* besitzt.

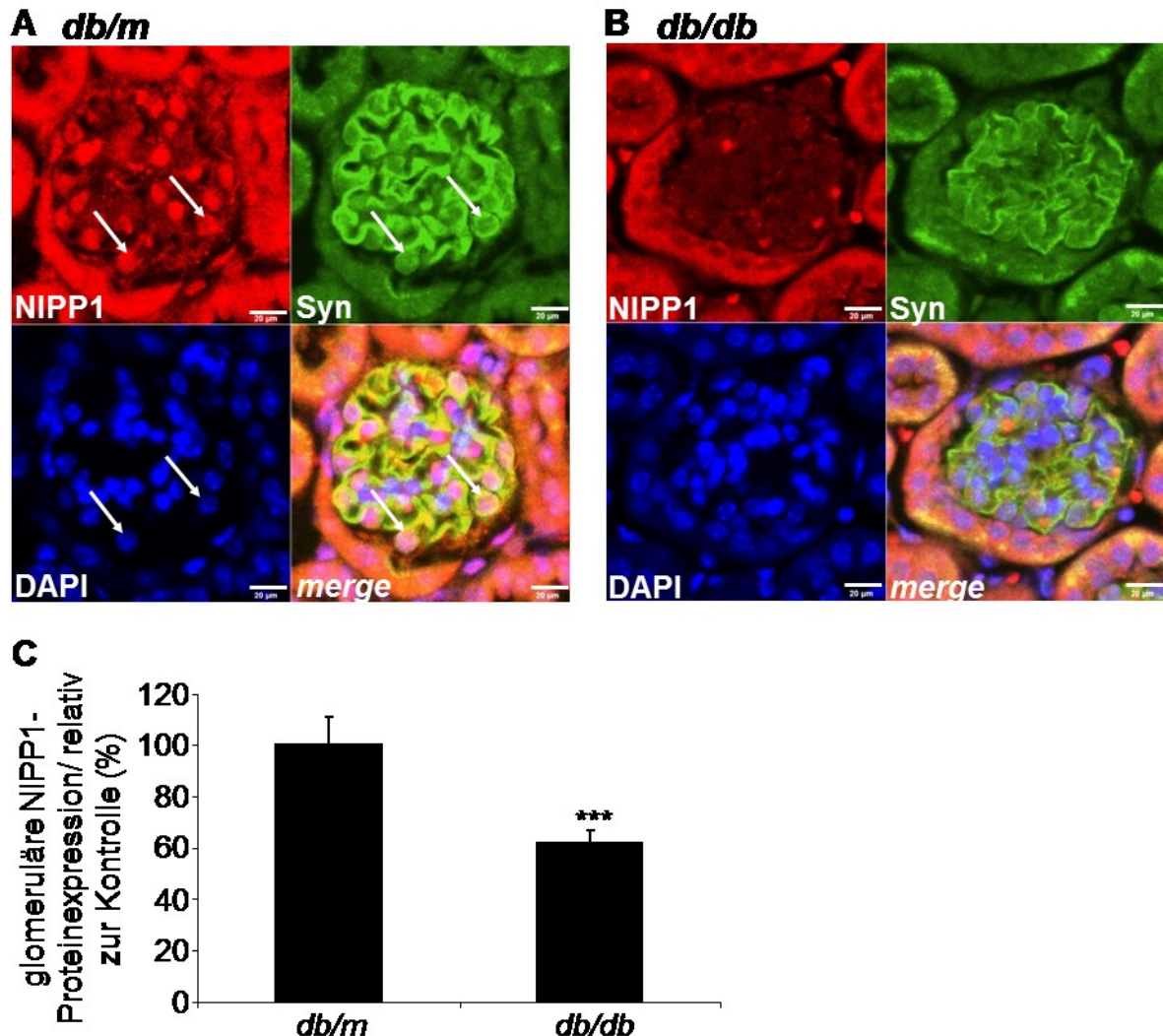


Abb. 31: IF Analyse der NIPP1-Proteinexpression in diabetischen *db/db*-Mäusen.

(A) IF Analyse von NIPP1 in den Podozyten von *db/m*-Mäusen. Die NIPP1-Expression in den Podozyten wird dargestellt über die Kolokalisation mit Synaptopodin (weiße Pfeile). Die DAPI-Färbung zeigt die nukleare Lokalisation von NIPP1. Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen der NIPP1-, Synaptopodin- und DAPI-Färbung sowie die *merge*-Bilder (Vergrößerung: 400x). (B) NIPP1-Expression in den Podozyten diabetischer Mäuse. Die NIPP1-Proteinexpression war in den Podozyten der *db/db*-Tiere signifikant geringer als in den Kontroll-*db/m*-Tieren; repräsentative Aufnahmen (Vergrößerung: 400x). Syn = Synaptopodin. (C) Auswertung der Intensität der NIPP1-Färbung in den glomerulären Bereichen; n = 5, Analyse von jeweils 10 Glomeruli; ***p<0,001 versus *db/m*.

Deshalb wurde die Expression von NIPP1 in den Nieren von *db/db*-Mäusen, einem Modell für den Typ 2 *Diabetes Mellitus*, und von entsprechenden Kontrolltieren (heterozygote, nicht diabetische *db/m*-Tiere) immunhistologisch an 4 µm Paraffinschnitten untersucht. Durch eine Doppelfärbung von NIPP1 mit Synaptopodin, einem Marker für differenzierte Podozyten [59], konnte die NIPP1-Expression in den Podozyten der Niere nachgewiesen werden. Die Analysen zeigten eine deutlich geringere NIPP1-Proteinexpression in den Podozyten von *db/db*-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren (**Abb. 31**). Vergleicht man die NIPP1-Expression mit der DAPI-Färbung wird auch erkennbar, dass NIPP1 in den Podozyten hauptsächlich nuklear lokalisiert ist (dargestellt über die weißen Pfeile in **Abb. 31**).

4. Diskussion

Für den humanen *Diabetes Mellitus* ist eine renale und vaskuläre Akkumulation von AGEs dokumentiert [5]. Diese induzieren strukturelle Veränderungen im Gewebe, die den Verlauf chronischer Erkrankungen wie der Diabetischen Nephropathie (DN) vermitteln [5, 68]. Die Progression renaler Erkrankungen mit einer steten Verminderung der glomerulären Filtrationsrate unterstützt die weitere Bildung und Akkumulation der AGEs. Dadurch werden pathophysiologische Mechanismen induziert, die sich gegenseitig bedingen und verstärken können [2]. Der AGE/RAGE-Signalweg trägt zu der Entwicklung und der Ausprägung pathophysiologischer Charakteristika der DN bei [11, 45]. Studien zeigten, dass die Podozyten bereits in frühen Stadien der DN irreversibel geschädigt werden [2, 62, 88]. Die dabei ablaufenden Prozesse wie eine zelluläre Hypertrophie mit einem Arrest in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus, das *Rearrangement* des podozytären Zytoskeletts und eine Verbreiterung der Füßchenfortsätze bedingen letztendlich die Loslösung der Podozyten von der glomerulären Basalmembran (GBM) [61, 62, 75]. Der Verlust an Podozyten bewirkt eine Schwächung der glomerulären Filtrationsbarriere (GFB) und trägt zu der bei der DN typischen Proteinurie bei [58, 59, 75]. Die molekularen Mechanismen, die eine Schädigung der Podozyten verursachen, konnten aber bisher noch nicht bis ins Detail geklärt werden [58, 59]. Um einen genaueren Einblick zu gewinnen wie die Exposition der Podozyten mit AGEs das Genexpressionsprofil der Zellen beeinflusst, wurden Differential Display Analysen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden konditional immortalisierte, terminal differenzierte Podozyten *in vitro* mit glykiertem BSA (AGE-BSA) inkubiert. Diese Untersuchungen zeigten, dass AGE-BSA die Expression diverser Gene in den Podozyten im Vergleich zu der Kontrollbehandlung mit Co-BSA verändert. Eines dieser Gene war NIPP1 [156]. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Expression von NIPP1 in differenzierten Podozyten bei Behandlung mit AGE-BSA im Detail zu analysieren. Initiale Untersuchungen belegten, dass NIPP1 in den Podozyten *in vitro* exprimiert wird und dass das Protein vorwiegend in dem Nukleus der Zellen lokalisiert ist, nur ein geringer Teil konnte im Zytoplasma nachgewiesen werden. RT PCR Analysen zeigten, dass AGE-BSA die NIPP1-mRNS-Expression in den Podozyten signifikant

unterdrückt. Dieser Effekt konnte auch auf Proteinebene mit Western Blots sowie mit der ICC nachgewiesen werden. Die Blockade von RAGE durch einen murinen RAGE-Antikörper zeigte, dass die Suppression von NIPP1 bei Inkubation der Podozyten mit glykiertem BSA durch RAGE vermittelt wird. Die Relevanz der *in vitro* Daten wurde in einem diabetischen Mausmodell überprüft. Über eine Doppelfärbung mit Synaptopodin, ein für Podozyten spezifisches Protein, wurde die NIPP1-Expression in den Podozyten von *db/db*-Tieren analysiert. Die IF Untersuchungen dokumentierten eine signifikant verminderte NIPP1-Proteinexpression in den diabetischen Mäusen im Vergleich zu den nicht diabetischen Kontrolltieren. Das unterstreicht die Parallelität zwischen der Suppression von NIPP1 durch AGE-BSA in differenzierten Podozyten *in vitro* und dem Einfluss von AGEs auf die NIPP1-Expression in diabetischen Mäusen. Die Resultate verdeutlichen, dass die NIPP1-Suppression ein wichtiges molekulares Ereignis bei der podozytären Schädigung in diabetischen Erkrankungen ist.

Für andere Zelltypen ist dargelegt, dass NIPP1 als inhibitorische Untereinheit der Proteinphosphatase 1 agiert, dabei besitzt NIPP1 seinen Wirkungsbereich vorwiegend im Zellkern [100]. Aus diesem Grund wurde die Aktivität von PP1 in einem Phosphatase Assay analysiert. Die Daten zeigten, dass die PP1-Aktivität bei AGE-BSA Behandlung der Podozyten signifikant höher war als bei Co-BSA. Die nächste Frage bestand darin, ob die erhöhte Phosphatase-Aktivität eine alleinige Folge der NIPP1-Suppression ist oder AGE-BSA auch die Expression der Phosphatase beeinflusst. Die Analysen der mRNA- und der Proteinexpression von PP1 zeigten aber keine Änderungen bei Inkubation der Podozyten mit AGE-BSA. Die Suppression von NIPP1 über eine transiente Transfektion mit NIPP1 siRNA-Duplexen gefolgt von der Analyse der PP1-Aktivität im Phosphatase Assay belegte, dass die verminderte NIPP1-Expression für die gesteigerte Aktivität der Phosphatase ausschlaggebend ist. Die Transfektion der Podozyten mit NIPP1 siRNA induzierte zudem keine Änderungen in der Expression von PP1. Die Daten bestätigten, dass NIPP1 auch in den Podozyten als regulatorische Untereinheit von PP1 agiert. Der im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Effekt, dass die Aktivität der Phosphatase nicht über die eigene Expression reguliert wird, sondern über die Expression der

regulatorischen Untereinheiten, ist bereits in der Literatur beschrieben [136, 137].

Bei den Untersuchungen wurde sich nicht auf eine der vier Isoformen der katalytischen Untereinheit (α , β/δ , γ_1 und γ_2) von PP1 konzentriert, da diese auf Proteinebene eine Sequenzhomologie von etwa 90%, vor allem im Bereich des strukturellen Kerns und des katalytischen Zentrums, aufweisen [137, 138, 141]. Viele Veröffentlichungen geben ebenfalls keine exakte Bezeichnung an, sondern sprechen allgemein von PP1. Im Fall von NIPP1 erwähnen nur die wenigsten Publikationen in diesem Zusammenhang PP1 α [108, 109, 157, 158]. Analysen von Trinkle-Mulcahy *et al.* [139] und Kim *et al.* [158] zeigten wiederum eine Interaktion von NIPP1 mit sowohl PP1 α und PP1 γ_1 bzw. PP1 β/δ . Da die Bindung von NIPP1 an die Phosphatase über konservierte Sequenzabschnitte von PP1 erfolgt [158], ist theoretisch eine Interaktion mit allen Isoformen möglich. In folgenden Arbeiten sollte die PP1-Isoform von NIPP1 in den Podozyten bestimmt werden.

Weiterhin wurde die Bedeutung von NIPP1 bzw. der verminderten NIPP1-Proteinexpression bei den *in vivo* beobachteten pathophysiologischen Vorgängen in den Podozyten untersucht. Grundlage dafür war eine frühere Arbeit unserer Arbeitsgruppe [154]. Diese zeigte eine Hochregulation des CKI-Proteins p27^{Kip1} und eine Hypertrophie in Verbindung mit einem Arrest in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus differenzierter Podozyten bei Behandlung mit AGE-BSA *in vitro* [154]. Als Marker für den Zellzyklus wurde dabei p27^{Kip1} gewählt, da das Protein in der Literatur als ein wichtiger Mediator bei der zellulären Hypertrophie und dem G₀/G₁-Arrest der Podozyten beschrieben ist [82, 90, 91, 159]. Um die Relevanz der NIPP1-Suppression bei diesen Vorgängen bewerten zu können, wurden die Podozyten mit NIPP1 siRNS transfiziert. Dabei konzentrierten sich die Studien zunächst auf die Analyse des Zellzyklusverhaltens der Podozyten. Reife Podozyten *in vivo* sind terminal differenzierte Zellen, die in der G₀-Phase des Zellzyklus ruhen [59, 61]. Dieses Ruhestadium ist essenziell für die Zellen. Eine Zellteilung würde für die Podozyten bedeuten, die hochorganisierte, komplexe Struktur des Zytoskelett aufzulösen, sowie den Verlust der Kontakte zu benachbarten Podozyten (definiert über die Schlitzmembran) und der Interaktion mit der GBM. Die Konsequenz wäre,

dass in diesem Moment die Podozyten in ihrer Funktion bei der glomerulären Filtration schwer beeinträchtigt wären und die GFB in ihrer Wirksamkeit geschwächt ist [59]. Bei der DN bedingen diverse Stimuli den Wiedereintritt der Podozyten in die G₁-Phase des Zellzyklus über eine verstärkte Expression von p21^{Cip1} und p27^{Kip1}, wobei die genauen Mechanismen noch nicht vollständig klar sind [59, 83]. Die Untersuchung der p27^{Kip1}-Expression durch Western Blot Analysen im Rahmen dieser Arbeit zeigte eine signifikant erhöhte p27^{Kip1}-Proteinexpression in den mit NIPP1 siRNS transfizierten Podozyten im Vergleich zu der co siRNS. Für die Analyse AGE-BSA behandelter Podozyten konnten vergleichbare Resultate erzielt werden. Die Daten bestätigen eine Rolle der NIPP1-Suppression bei dem durch AGEs induzierten Zellzyklusarrest der Podozyten. In der Literatur ist beschrieben, dass der über die erhöhte Expression von p27^{Kip1} vermittelte Wiedereintritt in die G₁-Phase mit einer Hypertrophie assoziiert ist [59, 160]. Die Podozyten entwickeln einen hypertrophen Zustand, da die CKIs die Zelle daran hindern in die S-Phase überzutreten. Das bedeutet, dass die Rückkehr in den Zellzyklus zwar eine vermehrte RNS- und Proteinsynthese induziert, aber die DNS wird letztendlich nicht repliziert und auch alle folgenden Schritte einer mitotischen Teilung unterbleiben. Dieses veränderte Verhältnis des Protein- zu DNS-Gehalts ist biochemisch definiert als Hypertrophie einer Zelle [84, 91]. Da die Suppression von NIPP1 durch siRNS Transfektion bereits eine Beteiligung von NIPP1 an dem Arrest in der G₀/G₁-Phase bekundete, wurde über die Messung des Zellumfangs und des Protein-Zellzahl Verhältnisses eine mögliche Hypertrophie der Podozyten untersucht. Die Resultate zeigten, dass bei Transfektion mit NIPP1 siRNS die Zellen einen hypertrophen Phänotyp entwickeln. Die Daten attestieren NIPP1 auch in diesem Punkt eine Rolle bei der *in vivo* beobachteten, durch AGEs induzierten Hypertrophie der Podozyten [90, 160]. Die Messung der BrdU-Inkorporationsrate in die DNS der Zellen und die Bestimmung der Anzahl an vitalen Zellen bei NIPP1-Suppression zeigte im Vergleich zu der Kontrollbehandlung keine Proliferation der Podozyten. Dass NIPP1 die Proliferationsfähigkeit und das Zellzyklusverhalten der Zelle beeinflusst, belegten auch van Eynde *et al.* [118]. Sie generierten NIPP1^{-/-}-Tiere, welche nach etwa 6 Tagen aufgrund einer stark eingeschränkten Proliferation der Zellen verstarben,

wohingegen NIPP1^{-/+}-Mäuse keinen offenkundigen Phänotyp aufwiesen. In NIPP1 siRNA *in vitro* Analysen konnten die Autoren zeigen, dass ein NIPP1-Knockout mit einer kompletten Blockade der zellulären Proliferation im Zusammenhang steht und betonten in Verbindung damit die Rolle von NIPP1 bei der G₁/S-Transition und/oder DNS-Replikation [118].

Der im Rahmen dieser Arbeit beobachtete G₀/G₁-Arrest der Podozyten kann in zwei Richtungen interpretiert werden. Einerseits über die Rolle von NIPP1 bei der Transkription und/oder dem Prozess des alternativen Splicings. Es wurde für NIPP1 eine Interaktion mit den Splicing-Faktoren SAP155, CDC5L und MELK bei dem Spliceosom-Zusammenbau und dem pre-mRNA-Splicing gezeigt [120, 122-124]. Zudem ist für MELK eine Funktion im Zellzyklus nachgewiesen [121]. Es ist auch bekannt, dass alle drei Moleküle in einem hyperphosphorylierten Zustand (phosphoryliert von mitotischen Kinasen) die FHA-Domäne von NIPP1 binden, was die Verbindung zwischen dem Splicing und dem Zellzyklus darstellen könnte [121, 125]. Zudem zeigten Jerebtsova *et al.* [126], dass PP1 die C-terminale Domäne der RNA-Polymerase II (RNAPII) dephosphoryliert und diese damit inaktiviert wird. Dies bedeutet, dass aktives NIPP1 für die Transkription benötigt wird [126]. Es ist somit wahrscheinlich, dass die NIPP1-Suppression einen Stopp im Zellzyklus an dem entsprechenden Checkpoint bedingt.

Andererseits ist bekannt, dass PP1 einen direkten Einfluss auf die G₁/S-Transition über die Regulation des Retinoblastom-Proteins pRb nimmt [161, 162]. Die Familie der Retinoblastom-Proteine (p107, p130 und pRb) besitzt eine wichtige Rolle in der G₁/S-Transition über die negative Regulation zweier positiver Regulatoren des Zellzyklus: die E2F-Transkriptionsfaktoren und die CDKs [155, 161]. Die Aktivierung der Zelle durch Wachstumsfaktoren bedingt die Aktivierung der CDKs, welche die Phosphorylierung und damit Inaktivierung der Rb-Proteine vermitteln, vorzugsweise am Ende der G₁-Phase. Dadurch wird der Transkriptionsfaktor E2F frei, welcher wiederum die Genexpression weiterer CDKs induziert [155]. Die Aktivierung der CDKs induziert die Phosphorylierung von p27^{Kip1} und damit dessen Abbau über den Ubiquitinweg. p27^{Kip1} wiederum kann die Aktivität der CDKs inhibieren und somit die

Rb-Proteine in einem aktivierten Zustand in der G₁-Phase halten [155, 161, 163]. pRb speziell unterbindet die gezielte Degradation von p27^{Kip1}, indem es die Aktivität der CDKs in der G₁-Phase gering hält. pRb vermittelt zudem den Abbau von Skp2 (*S-phase kinase associated protein 2*), einem Adaptorprotein, welches für die Degradation von p27^{Kip1} nötig ist [155, 164, 165]. PP1 ist direkt als die Phosphatase bestimmt worden, die pRb am Ende der mitotischen Phase dephosphoryliert und damit aktiviert [155, 161, 162, 166], wobei Kolupaeva *et al.* [161] PNUTS als regulatorische Untereinheit von PP1 in diesem Zusammenhang beschrieben (allerdings konnten die Autoren diesen Effekt nur in Tumorzellen nachweisen) [161]. Aufgrund der Beobachtung, dass eine Suppression von NIPP1 in den Podozyten einen Arrest der Zellen in der G₁-Phase induziert, in Verbindung mit der erhöhten p27^{Kip1}-Proteinexpression und einer zellulären Hypertrophie, kann davon ausgegangen werden, dass NIPP1 wichtig ist. Die bei der verminderter Expression von NIPP1 beobachtete gesteigerte Aktivität von PP1 könnte durchaus eine permanente Dephosphorylierung von pRb bewirken und damit den Verbleib der Zellen in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus und die Induktion einer Hypertrophie bedingen. Für die Klärung dieser Vermutung müsste in einem nächsten Schritt das Zellzyklusprotein pRb analysiert werden, genauer sein Phosphorylierungszustand in Abhängigkeit der NIPP1-Expression bzw. PP1-Aktivität und dementsprechend bei Behandlung der Podozyten mit AGE-BSA.

Apoptose von Podozyten wird kontrovers diskutiert. Dabei geht es speziell darum, ob die Ablösung der Podozyten von der GBM durch apoptotische Vorgänge in den Zellen induziert wird oder der Grund in dem Verlust der Zell-Zell- bzw. der Zell-Matrix-Kontakte liegt bzw. eher in Zellnekrosen [2, 82, 87, 167]. Die beschriebene Apoptose in Podozyten resultiert bisher nur von *in vitro* Analysen oder von Tiermodellen für die DN, direkte Nachweise für eine podozytäre Apoptose bei der humanen DN fehlen bisher [82, 167, 168]. Hinweise für apoptotische Vorgänge bei dem Verlust der Podozyten sind dabei der Nachweis einer erhöhten Aktivität von TGFβ oder von ROS, die Aktivierung der p38-, der p53-Signaltransduktionskaskade und/oder die Hemmung des PI3K/ Akt-Wegs in diabetischen Tiermodellen oder in der experimentellen Zellkultur [84, 87, 88, 167-169]. Im Gegensatz hierzu konnten Yu *et*

al. [170] in diversen Modellen einer glomerulären Schädigung im Urin der Tiere noch lebende Podozyten nachweisen und sogar kultivieren [170]. Inzwischen existiert aber auch die Hypothese, dass mehrere unterschiedliche Vorgänge zu dem Verlust der Podozyten bei der DN beitragen können. Hämodynamische und metabolische Faktoren können sowohl apoptotische Vorgänge oder Nekrose, als auch die Ablösung der Podozyten durch den Verlust der Zell-Zell-Interaktion bzw. der Zell-Matrix-Kontakte induzieren [82, 84, 169]. Wie auch die Studie von Rüster *et al.* [154] zeigten die Analysen der vorliegenden Dissertationsarbeit keine Induktion von Apoptose bei Behandlung der Podozyten mit AGE-BSA *in vitro*, hingegen konnte vielmehr eine Nekrose der Zellen nachgewiesen werden. Die Resultate unserer Arbeitsgruppe unterstützen demzufolge die Theorie, dass in den Podozyten *in vivo* keine Apoptose induziert wird, sondern durch die hyperglykämischen Bedingungen wie eine vermehrte Bildung und Akkumulation von AGEs die Zellen nekrotisch werden und dass das mit ein Grund für die Ablösung von der GBM ist. Die Frage war dann, ob die alleinige Suppression von NIPP1 durch Transfektion mit NIPP1 siRNS in den Podozyten Apoptose induziert. Sowohl die Resultate des TUNEL Assays als auch die des Annexin-V Assays belegten keine Apoptose in den mit NIPP1 siRNS transfizierten Zellen im Vergleich zu co siRNS. Im Gegensatz zu der AGE-BSA Behandlung konnte aber auch keine Nekrose detektiert werden. Dabei muss aber beachtet werden, dass die Inkubation der Podozyten mit AGE-BSA die Expression einer Vielzahl an Genen verändert und damit diverse Mechanismen und Signaltransduktionswege beeinflusst im Gegensatz zu der NIPP1 siRNS Transfektion, bei der gezielt nur die Transkription eines Gens ausgeschaltet wird. Van Eynde *et al.* [118] beschrieben für die Suppression von NIPP1 ebenfalls keine Apoptose. Diese Studien zeigten, dass die frühe Letalität der NIPP1^{-/-}-Embryos nicht durch apoptotische Aktivität, sondern durch die verminderte Proliferationsfähigkeit der Zellen bedingt war [118].

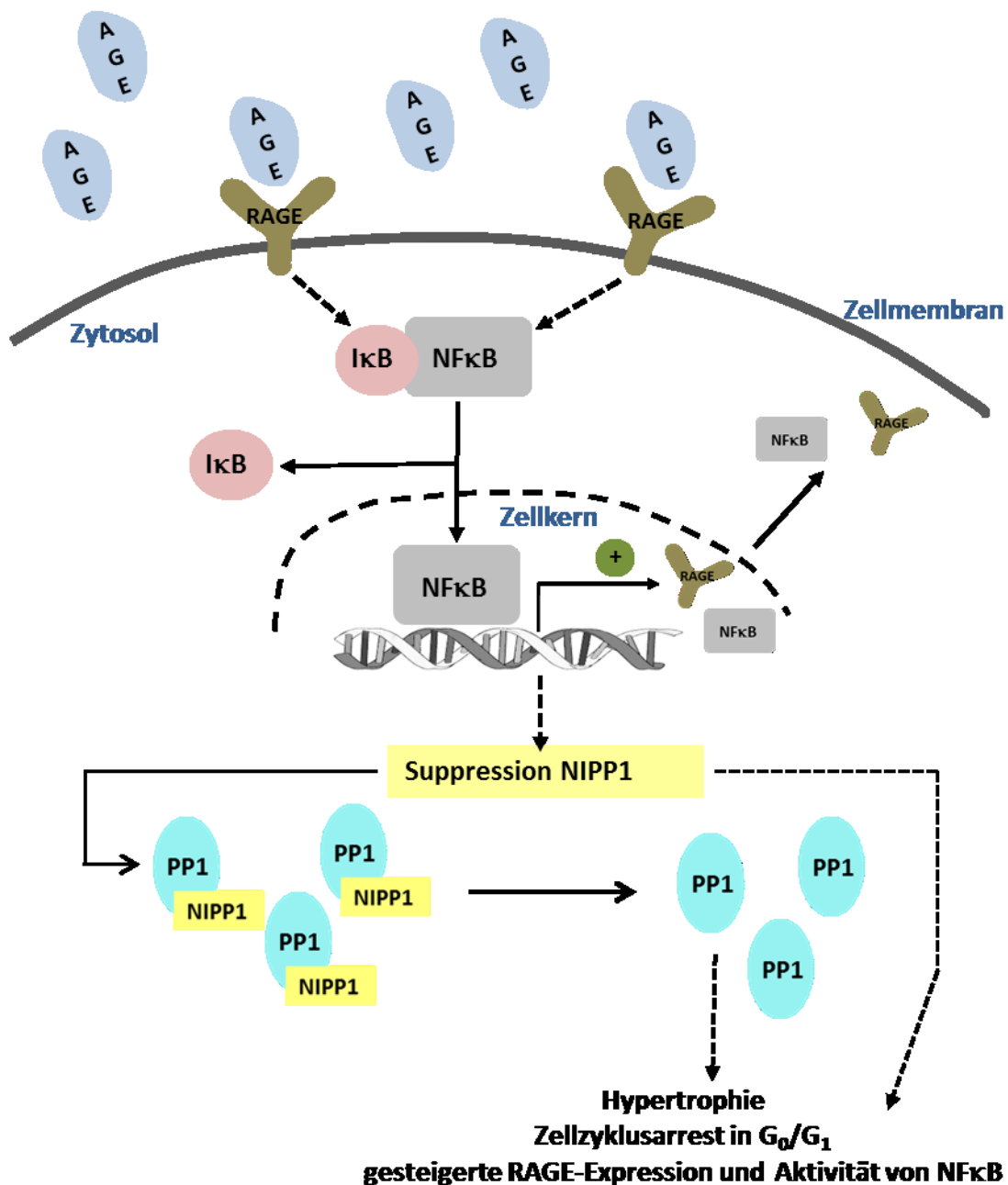


Abb. 32: Hypothetische Darstellung der AGE-vermittelten NIPP1-Suppression in differenzierten Podozyten.

Die Abbildung zeigt den vermuteten Signaltransduktionsweg, der die Suppression von NIPP1 bei Behandlung der Podozyten mit AGE-BSA induziert. Die verminderte Expression von NIPP1 in Verbindung mit einer erhöhten Aktivität von PP1 resultiert in diversen pathophysiologischen Charakteristika, die für die Podozyten bei der DN beobachtet wurden. AGE-advanced glycation end-products; RAGE-Rezeptor für AGEs; NFκB-nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells; IκB-Inhibitor von NFκB; PP1-Proteinphosphatase 1; NIPP1-nuclear inhibitor of PP1.

Die Analysen im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass die AGE-BSA Effekte hinsichtlich der Expression von NIPP1 über RAGE vermittelt werden. RAGE induziert die Expression diverser inflammatorischer Gene wie $\text{TNF}\alpha$ und seine eigene über den Transkriptionsfaktor $\text{NF}\kappa\text{B}$ [11, 46, 62]. Eigene immuncytochemische Analysen zeigten, dass die Inkubation der Podozyten mit glykiertem BSA eine signifikant gesteigerte RAGE-Proteinexpression induziert. Die Resultate der vorliegenden Arbeit belegten, dass die NIPP1-Suppression den Transkriptionsfaktor $\text{NF}\kappa\text{B}$ aktiviert. Zudem konnte für die NIPP1 siRNS Transfektion im Vergleich zu der Kontrollreaktion eine signifikant höhere RAGE-Proteinexpression immuncytochemisch nachgewiesen werden. Die durch AGE-BSA induzierte Suppression von NIPP1 ist daher in den AGE/RAGE-Signaltransduktionsweg involviert. In **Abbildung 32** sind der vermutete Mechanismus der AGE/RAGE-induzierten NIPP1-Suppression und deren Konsequenzen für den Podozyt zusammenfassend graphisch dargestellt. Es kann aber letztendlich nicht bewiesen werden, ob die verminderte NIPP1-Expression selbst diese Effekte vermittelt oder die gesteigerte Aktivität von PP1. Für NIPP1 ist bekannt, dass das Molekül in Verbindung mit EED und EZH2 als transkriptioneller Repressor fungiert, die ein Teil des *Polycomb Repressive Complex* (PRC) 2 sind [129, 130]. Zusammen mit dem PRC 1 induziert der PRC 2 das PcG-vermittelte Gen-*Silencing*. Dabei initiiert der PRC2 den Prozess über die Trimethylierung der Histone H3 an dem Lysin 27 (H3K27) durch EZH2. Das trimethylierte H3K27 ist die initiale Bindestelle für den PRC 1, welcher das Gen-*Silencing* ausführt. Für NIPP1 wurde dabei eine direkte Interaktion mit EED und EZH2 nachgewiesen und es ist dokumentiert, dass NIPP1 die Bindung des PRC2 an die Zielgene moduliert [127-130]. Dadurch kann angenommen werden, dass die verminderte Konzentration von NIPP1 das PRC-vermittelte Gen-*Silencing* unterbindet und dadurch wiederum eine vermehrte Expression diverser Gene bedingt. Ob dieser Mechanismus für die RAGE- und $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Genexpression zutreffend ist, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht. Eine direkte Verbindung zwischen der gesteigerten Aktivität von PP1, der steten Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ und der Expression von RAGE ist hingegen bisher nicht bekannt und wurde auch bislang nicht in der Literatur beschrieben. Für die AGE-BSA Behandlung der Podozyten konnte für die

24-stündige Inkubation keine NF κ B-Aktivität mehr nachgewiesen werden. Für NF κ B ist dokumentiert, dass der Transkriptionsfaktor eine oszillierende Aktivität besitzt [171, 172]. Somit ist es möglich, dass die Messung nach 24 Stunden für die Transfektion ein Resultat zeigte, für die Behandlung mit AGE-BSA hingegen nicht. Studien unserer Arbeitsgruppe, bei denen die Aktivität von NF κ B 1 h und 4 h nach Zugabe von AGE-BSA gemessen wurde, zeigten eine signifikant erhöhte Aktivität des Transkriptionsfaktors (nicht veröffentlichte Resultate).

Der genaue Mechanismus der Suppression von NIPP1 über den AGE/RAGE-Signalweg ist noch nicht geklärt. Aber es ist bekannt, dass die Promotorregion des NIPP1-Gens eine Bindesequenz für E2F besitzt [118]. Wie bereits erwähnt wurde, bildet dieser Transkriptionsfaktor in der G₁-Phase des Zellzyklus einen Komplex mit pRb und wird erst aktiviert, wenn er nach der Phosphorylierung von pRb bei dem Übergang in die S-Phase freigesetzt wird [155, 161]. Unter der hypothetischen Annahme, dass PP1 das Protein pRb in einem hypophosphorylierten und damit aktivierten Zustand hält, bleibt E2F in diesem Komplex gebunden und deshalb unterbleibt die Transkription der von diesem Transkriptionsfaktor regulierten Gene wie zum Beispiel NIPP1.

Letztendlich kann festgehalten werden, dass die in der Zielsetzung gefassten Fragestellungen im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden konnten. Die Daten zeigten, dass

- AGE-BSA die Expression von NIPP1 in den Podozyten unterdrückt,
- die verminderte NIPP1-Expression eine erhöhte Aktivität von PP1 verursacht, wobei die Expression von PP1 durch die AGE-BSA Behandlung der Podozyten nicht beeinflusst wird,
- die Unterdrückung der NIPP1-Expression in den Podozyten über die AGE/RAGE-Achse vermittelt wird,
- die Suppression von NIPP1 eine Hypertrophie der Podozyten in Verbindung mit einem Arrest der Zellen in der G₀/G₁-Phase sowie eine verminderte

Proliferation verursacht, aber keine Apoptose induziert,

- die Suppression von NIPP1 den RAGE-Signaltransduktionsweg in Gang setzt und den Transkriptionsfaktors NF κ B aktiviert,
- die Expression von NIPP1 auch *in vivo* in den Podozyten von *db/db*-Tieren vermindert ist.

Die *in vitro* unter AGE-BSA beobachtete Suppression von NIPP1 in den Podozyten beeinflusst also pathophysiologische Vorgänge, die *in vivo* charakteristisch für den Verlust der Podozyten bei der DN sind. Um eine Funktion von PP1 in diesem Prozess zu konkretisieren müsste in weiterführenden Arbeiten untersucht werden, ob die Überexpression von PP1 dieselben Auswirkungen in den Podozyten hervorruft wie die Transfektion mit NIPP1 siRNS. Erst dann kann geklärt werden, ob die beobachteten Vorgänge bei der NIPP1-Suppression PP1-abhängige oder -unabhängige Effekte von NIPP1 sind.

5. Literaturverzeichnis

1. Ahmed, N., *Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications*. Diabetes Res Clin Pract, 2005. **67**(1): p. 3-21.
2. Busch, M., et al., *Advanced glycation end-products and the kidney*. Eur J Clin Invest. **40**(8): p. 742-55.
3. Ulrich, P. and A. Cerami, *Protein glycation, diabetes, and aging*. Recent Prog Horm Res, 2001. **56**: p. 1-21.
4. Bucala, R. and A. Cerami, *Advanced glycosylation: chemistry, biology, and implications for diabetes and aging*. Adv Pharmacol, 1992. **23**: p. 1-34.
5. Bohlender, J.M., et al., *Advanced glycation end products and the kidney*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **289**(4): p. F645-59.
6. Singh, R., et al., *Advanced glycation end-products: a review*. Diabetologia, 2001. **44**(2): p. 129-46.
7. Thornalley, P.J., A. Langborg, and H.S. Minhas, *Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose*. Biochem J, 1999. **344 Pt 1**: p. 109-16.
8. Baynes, J.W. and S.R. Thorpe, *Role of oxidative stress in diabetic complications - A new perspective on an old paradigm*. Diabetes, 1999. **48**(1): p. 1-9.
9. Bierhaus, A., et al., *AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept*. Cardiovasc Res, 1998. **37**(3): p. 586-600.
10. Vlassara, H. and M.R. Palace, *Glycoxidation: the menace of diabetes and aging*. Mt Sinai J Med, 2003. **70**(4): p. 232-41.
11. Wendt, T., et al., *Glucose, glycation, and RAGE: implications for amplification of cellular dysfunction in diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(5): p. 1383-95.
12. Schmidt, A.M., S.D. Yan, and D.M. Stern, *The dark side of glucose*. Nat Med, 1995. **1**(10): p. 1002-4.
13. Ramasamy, R., S.F. Yan, and A.M. Schmidt, *Advanced glycation endproducts: from precursors to RAGE: round and round we go*. Amino Acids. **42**(4): p. 1151-61.
14. Bunn, H.F. and P.J. Higgins, *Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance*. Science, 1981. **213**(4504): p. 222-4.
15. Wolff, S.P. and R.T. Dean, *Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes*. Biochem J, 1987. **245**(1): p. 243-50.
16. Hunt, J.V., M.A. Bottoms, and M.J. Mitchinson, *Oxidative alterations in the experimental glycation model of diabetes mellitus are due to protein-glucose adduct oxidation. Some fundamental differences in proposed mechanisms of glucose oxidation and oxidant production*. Biochem J, 1993. **291 (Pt 2)**: p. 529-35.
17. Jiang, Z.Y., A.C. Woollard, and S.P. Wolff, *Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation*. FEBS Lett, 1990. **268**(1): p. 69-71.

18. O'Brien, J. and P.A. Morrissey, *Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods*. Crit Rev Food Sci Nutr, 1989. **28**(3): p. 211-48.
19. Bengmark, S., *Impact of nutrition on ageing and disease*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2006. **9**(1): p. 2-7.
20. Koschinsky, T., et al., *Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(12): p. 6474-9.
21. Thornalley, P.J., *Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 1998. **44**(7): p. 1013-23.
22. Takata, K., et al., *Endocytic uptake of nonenzymatically glycosylated proteins is mediated by a scavenger receptor for aldehyde-modified proteins*. J Biol Chem, 1988. **263**(29): p. 14819-25.
23. Araki, N., et al., *Macrophage scavenger receptor mediates the endocytic uptake and degradation of advanced glycation end products of the Maillard reaction*. Eur J Biochem, 1995. **230**(2): p. 408-15.
24. Li, Y.M., et al., *Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 11047-52.
25. Miyazaki, A., H. Nakayama, and S. Horiuchi, *Scavenger receptors that recognize advanced glycation end products*. Trends Cardiovasc Med, 2002. **12**(6): p. 258-62.
26. Vlassara, H., et al., *Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE): a new member of the AGE-receptor complex*. Mol Med, 1995. **1**(6): p. 634-46.
27. Ohgami, N., et al., *CD36, a member of class B scavenger receptor family, is a receptor for advanced glycation end products*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **947**: p. 350-5.
28. Wendt, T.M., et al., *RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy*. Am J Pathol, 2003. **162**(4): p. 1123-37.
29. Gugliucci, A. and M. Bendayan, *Reaction of advanced glycation endproducts with renal tissue from normal and streptozotocin-induced diabetic rats: an ultrastructural study using colloidal gold cytochemistry*. J Histochem Cytochem, 1995. **43**(6): p. 591-600.
30. Horie, K., et al., *Immunohistochemical colocalization of glycoxidation products and lipid peroxidation products in diabetic renal glomerular lesions. Implication for glycoxidative stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy*. J Clin Invest, 1997. **100**(12): p. 2995-3004.
31. Schmidt, A.M., et al., *The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses*. J Clin Invest, 2001. **108**(7): p. 949-55.
32. Monnier, V.M., *Intervention against the Maillard reaction in vivo*. Arch Biochem Biophys, 2003. **419**(1): p. 1-15.

33. Vlassara, H., R. Bucala, and L. Striker, *Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging*. Lab Invest, 1994. **70**(2): p. 138-51.
34. Sugiyama, S., et al., *Advanced glycation end-products in diabetic nephropathy*. Nephrol Dial Transplant, 1996. **11 Suppl 5**: p. 91-4.
35. Nishino, T., et al., *Immunohistochemical detection of advanced glycosylation end products within the vascular lesions and glomeruli in diabetic nephropathy*. Hum Pathol, 1995. **26**(3): p. 308-13.
36. Makita, Z., et al., *Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy*. N Engl J Med, 1991. **325**(12): p. 836-42.
37. Mitsuhashi, T., et al., *Immunochemical detection of advanced glycation end products in renal cortex from STZ-induced diabetic rat*. Diabetes, 1993. **42**(6): p. 826-32.
38. Shikata, K., et al., *Localization of advanced glycation endproducts in the kidney of experimental diabetic rats*. J Diabetes Complications, 1995. **9**(4): p. 269-71.
39. Vlassara, H., et al., *Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(24): p. 11704-8.
40. Niwa, T., et al., *Immunohistochemical detection of imidazolone, a novel advanced glycation end product, in kidneys and aortas of diabetic patients*. J Clin Invest, 1997. **99**(6): p. 1272-80.
41. Tanji, N., et al., *Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal disease*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(9): p. 1656-66.
42. Neeper, M., et al., *Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins*. J Biol Chem, 1992. **267**(21): p. 14998-5004.
43. Dattilo, B.M., et al., *The extracellular region of the receptor for advanced glycation end products is composed of two independent structural units*. Biochemistry, 2007. **46**(23): p. 6957-70.
44. Kislinger, T., et al., *N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression*. J Biol Chem, 1999. **274**(44): p. 31740-9.
45. Bierhaus, A. and P.P. Nawroth, *Multiple levels of regulation determine the role of the receptor for AGE (RAGE) as common soil in inflammation, immune responses and diabetes mellitus and its complications*. Diabetologia, 2009. **52**(11): p. 2251-63.
46. Bierhaus, A., et al., *Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products*. J Mol Med (Berl), 2005. **83**(11): p. 876-86.
47. Matsumoto, S., et al., *Solution structure of the variable-type domain of the receptor for advanced glycation end products: new insight into AGE-RAGE interaction*. Biochemistry, 2008. **47**(47): p. 12299-311.

48. Xie, J., et al., *Structural basis for pattern recognition by the receptor for advanced glycation end products (RAGE)*. J Biol Chem, 2008. **283**(40): p. 27255-69.
49. Lin, L., *RAGE on the Toll Road?* Cell Mol Immunol, 2006. **3**(5): p. 351-8.
50. Li, J. and A.M. Schmidt, *Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products*. J Biol Chem, 1997. **272**(26): p. 16498-506.
51. Neumann, A., et al., *High molecular weight hyaluronic acid inhibits advanced glycation endproduct-induced NF-kappaB activation and cytokine expression*. FEBS Lett, 1999. **453**(3): p. 283-7.
52. Bierhaus, A., et al., *Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB*. Diabetes, 2001. **50**(12): p. 2792-808.
53. Soulis, T., et al., *Advanced glycation end products and their receptors co-localise in rat organs susceptible to diabetic microvascular injury*. Diabetologia, 1997. **40**(6): p. 619-28.
54. Tan, A.L., et al., *Disparate effects on renal and oxidative parameters following RAGE deletion, AGE accumulation inhibition, or dietary AGE control in experimental diabetic nephropathy*. Am J Physiol Renal Physiol. **298**(3): p. F763-70.
55. Reiniger, N., et al., *Deletion of the Receptor for Advanced Glycation End Products Reduces Glomerulosclerosis and Preserves Renal Function in the Diabetic OVE26 Mouse*. Diabetes, 2010. **59**(8): p. 2043-2054.
56. Yamamoto, Y., et al., *Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in RAGE-overexpressing mice*. J Clin Invest, 2001. **108**(2): p. 261-8.
57. Jefferson, J.A., et al., *Podocyte disorders: Core Curriculum 2011*. Am J Kidney Dis. **58**(4): p. 666-77.
58. Leeuwis, J.W., et al., *Targeting podocyte-associated diseases*. Adv Drug Deliv Rev. **62**(14): p. 1325-36.
59. Pavenstadt, H., W. Kriz, and M. Kretzler, *Cell biology of the glomerular podocyte*. Physiol Rev, 2003. **83**(1): p. 253-307.
60. Quaggin, S.E. and J.A. Kreidberg, *Development of the renal glomerulus: good neighbors and good fences*. Development, 2008. **135**(4): p. 609-20.
61. Kriz, W., *Progressive renal failure--inability of podocytes to replicate and the consequences for development of glomerulosclerosis*. Nephrol Dial Transplant, 1996. **11**(9): p. 1738-42.
62. Stitt-Cavanagh, E., L. MacLeod, and C. Kennedy, *The podocyte in diabetic kidney disease*. ScientificWorldJournal, 2009. **9**: p. 1127-39.
63. Deen, W.M., M.J. Lazzara, and B.D. Myers, *Structural determinants of glomerular permeability*. Am J Physiol Renal Physiol, 2001. **281**(4): p. F579-96.
64. Kalluri, R., *Proteinuria with and without renal glomerular podocyte effacement*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(9): p. 2383-9.
65. Yamagishi, S. and T. Matsui, *Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy*. Oxid Med Cell Longev. **3**(2): p. 101-8.

66. Marshall, S.M., *The podocyte: a major player in the development of diabetic nephropathy?* Horm Metab Res, 2005. **37 Suppl 1**: p. 9-16.
67. Hayden, M.R., A. Whaley-Connell, and J.R. Sowers, *Renal redox stress and remodeling in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and diabetic nephropathy: paying homage to the podocyte.* Am J Nephrol, 2005. **25**(6): p. 553-69.
68. Vlassara, H. and M.R. Palace, *Diabetes and advanced glycation endproducts.* J Intern Med, 2002. **251**(2): p. 87-101.
69. Najafian, B., C.E. Alpers, and A.B. Fogo, *Pathology of human diabetic nephropathy.* Contrib Nephrol. **170**: p. 36-47.
70. Dronavalli, S., I. Duka, and G.L. Bakris, *The pathogenesis of diabetic nephropathy.* Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2008. **4**(8): p. 444-52.
71. Wautier, J.L. and P.J. Guillausseau, *Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy.* Diabetes Metab, 2001. **27**(5 Pt 1): p. 535-42.
72. Breyer, M.D., et al., *Mouse models of diabetic nephropathy.* J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(1): p. 27-45.
73. Peters, V. and C.P. Schmitt, *Murine models of diabetic nephropathy.* Exp Clin Endocrinol Diabetes. **120**(4): p. 191-3.
74. Tesch, G.H. and D.J. Nikolic-Paterson, *Recent insights into experimental mouse models of diabetic nephropathy.* Nephron Exp Nephrol, 2006. **104**(2): p. e57-62.
75. Barisoni, L. and P. Mundel, *Podocyte biology and the emerging understanding of podocyte diseases.* Am J Nephrol, 2003. **23**(5): p. 353-60.
76. Sawada, H., et al., *Epithelial polyanion (podocalyxin) is found on the sides but not the soles of the foot processes of the glomerular epithelium.* Am J Pathol, 1986. **125**(2): p. 309-18.
77. Kerjaschki, D., D.J. Sharkey, and M.G. Farquhar, *Identification and characterization of podocalyxin--the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell.* J Cell Biol, 1984. **98**(4): p. 1591-6.
78. Adler, S., *Characterization of glomerular epithelial cell matrix receptors.* Am J Pathol, 1992. **141**(3): p. 571-8.
79. Furukawa, T., et al., *Morphometric study of glomerular slit diaphragms fixed by rapid-freezing and freeze-substitution.* Kidney Int, 1991. **40**(4): p. 621-4.
80. Shirato, I., *Podocyte process effacement in vivo.* Microsc Res Tech, 2002. **57**(4): p. 241-6.
81. Kriz, W., et al., *Structure-stabilizing forces in the glomerular tuft.* J Am Soc Nephrol, 1995. **5**(10): p. 1731-9.
82. Lewko, B. and J. Stepinski, *Hyperglycemia and mechanical stress: targeting the renal podocyte.* J Cell Physiol, 2009. **221**(2): p. 288-95.
83. Shankland, S.J. and G. Wolf, *Cell cycle regulatory proteins in renal disease: role in hypertrophy, proliferation, and apoptosis.* Am J Physiol Renal Physiol, 2000. **278**(4): p. F515-29.
84. Marshall, C.B. and S.J. Shankland, *Cell cycle and glomerular disease: a minireview.* Nephron Exp Nephrol, 2006. **102**(2): p. e39-48.

85. Mundel, P., et al., *Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines*. Exp Cell Res, 1997. **236**(1): p. 248-58.
86. Jat, P.S., et al., *Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(12): p. 5096-100.
87. Wolf, G., S. Chen, and F.N. Ziyadeh, *From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy*. Diabetes, 2005. **54**(6): p. 1626-34.
88. Reddy, G.R., et al., *The podocyte and diabetes mellitus: is the podocyte the key to the origins of diabetic nephropathy?* Curr Opin Nephrol Hypertens, 2008. **17**(1): p. 32-6.
89. Endlich, N., et al., *Podocytes respond to mechanical stress in vitro*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(3): p. 413-22.
90. Kim, N.H., *Podocyte hypertrophy in diabetic nephropathy*. Nephrology (Carlton), 2005. **10 Suppl**: p. S14-6.
91. Wolf, G. and S.J. Shankland, *P27Kip1: the "rosebud" of diabetic nephropathy?* J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(3): p. 819-22.
92. Coimbra, T.M., et al., *Early events leading to renal injury in obese Zucker (fatty) rats with type II diabetes*. Kidney Int, 2000. **57**(1): p. 167-82.
93. Pagtalunan, M.E., et al., *Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes*. J Clin Invest, 1997. **99**(2): p. 342-8.
94. Steffes, M.W., et al., *Glomerular cell number in normal subjects and in type 1 diabetic patients*. Kidney Int, 2001. **59**(6): p. 2104-13.
95. Teiken, J.M., et al., *Podocyte loss in aging OVE26 diabetic mice*. Anat Rec (Hoboken), 2008. **291**(1): p. 114-21.
96. Dalla Vestra, M., et al., *Is podocyte injury relevant in diabetic nephropathy? Studies in patients with type 2 diabetes*. Diabetes, 2003. **52**(4): p. 1031-5.
97. Siu, B., et al., *Reduction in podocyte density as a pathologic feature in early diabetic nephropathy in rodents: prevention by lipoic acid treatment*. BMC Nephrol, 2006. **7**: p. 6.
98. White, K.E., et al., *Podocyte number in normotensive type 1 diabetic patients with albuminuria*. Diabetes, 2002. **51**(10): p. 3083-9.
99. White, K.E. and R.W. Bilous, *Structural alterations to the podocyte are related to proteinuria in type 2 diabetic patients*. Nephrol Dial Transplant, 2004. **19**(6): p. 1437-40.
100. Beullens, M., et al., *The isolation of novel inhibitory polypeptides of protein phosphatase 1 from bovine thymus nuclei*. J Biol Chem, 1992. **267**(23): p. 16538-44.
101. Van Eynde, A., et al., *Molecular cloning of NIPP-1, a nuclear inhibitor of protein phosphatase-1, reveals homology with polypeptides involved in RNA processing*. J Biol Chem, 1995. **270**(47): p. 28068-74.
102. Beullens, M., et al., *Molecular determinants of nuclear protein phosphatase-1 regulation by NIPP-1*. J Biol Chem, 1999. **274**(20): p. 14053-61.

103. Van Eynde, A., et al., *Organization and alternate splice products of the gene encoding nuclear inhibitor of protein phosphatase-1 (NIPP-1)*. Eur J Biochem, 1999. **261**(1): p. 291-300.
104. Jin, Q., et al., *Mapping of the RNA-binding and endoribonuclease domains of NIPP1, a nuclear targeting subunit of protein phosphatase 1*. Biochem J, 1999. **342 (Pt 1)**: p. 13-9.
105. Chang, A.C., et al., *Alternative splicing regulates the production of ARD-1 endoribonuclease and NIPP-1, an inhibitor of protein phosphatase-1, as isoforms encoded by the same gene*. Gene, 1999. **240**(1): p. 45-55.
106. Vulsteke, V., et al., *Properties and phosphorylation sites of baculovirus-expressed nuclear inhibitor of protein phosphatase-1 (NIPP-1)*. J Biol Chem, 1997. **272**(52): p. 32972-8.
107. Beullens, M., et al., *The C-terminus of NIPP1 (nuclear inhibitor of protein phosphatase-1) contains a novel binding site for protein phosphatase-1 that is controlled by tyrosine phosphorylation and RNA binding*. Biochem J, 2000. **352 Pt 3**: p. 651-8.
108. Beullens, M., et al., *Inactivation of nuclear inhibitory polypeptides of protein phosphatase-1 (NIPP-1) by protein kinase A*. J Biol Chem, 1993. **268**(18): p. 13172-7.
109. Van Eynde, A., et al., *Full activation of a nuclear species of protein phosphatase-1 by phosphorylation with protein kinase A and casein kinase-2*. Biochem J, 1994. **297 (Pt 3)**: p. 447-9.
110. Jagiello, I., et al., *NIPP-1, a nuclear inhibitory subunit of protein phosphatase-1, has RNA-binding properties*. J Biol Chem, 1997. **272**(35): p. 22067-71.
111. Parker, L., et al., *Functional interaction between nuclear inhibitor of protein phosphatase type 1 (NIPP1) and protein phosphatase type 1 (PP1) in Drosophila: consequences of over-expression of NIPP1 in flies and suppression by co-expression of PP1*. Biochem J, 2002. **368**(Pt 3): p. 789-97.
112. Jagiello, I., et al., *Nuclear and subnuclear targeting sequences of the protein phosphatase-1 regulator NIPP1*. J Cell Sci, 2000. **113 Pt 21**: p. 3761-8.
113. Durocher, D. and S.P. Jackson, *The FHA domain*. FEBS Lett, 2002. **513**(1): p. 58-66.
114. Kumeta, H., et al., *The NMR structure of the NIPP1 FHA domain*. J Biomol NMR, 2008. **40**(3): p. 219-24.
115. Trinkle-Mulcahy, L., et al., *Nuclear organisation of NIPP1, a regulatory subunit of protein phosphatase 1 that associates with pre-mRNA splicing factors*. J Cell Sci, 1999. **112 (Pt 2)**: p. 157-68.
116. Lamond, A.I. and D.L. Spector, *Nuclear speckles: a model for nuclear organelles*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(8): p. 605-12.
117. Spector, D.L., *Nuclear domains*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 16): p. 2891-3.
118. Van Eynde, A., et al., *The nuclear scaffold protein NIPP1 is essential for early embryonic development and cell proliferation*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(13): p. 5863-74.
119. Wera, S., et al., *Inhibition of translation by mRNA encoding NIPP-1, a nuclear inhibitor of protein phosphatase-1*. Eur J Biochem, 1997. **247**(1): p. 411-5.

120. Beullens, M. and M. Bollen, *The protein phosphatase-1 regulator NIPP1 is also a splicing factor involved in a late step of spliceosome assembly*. J Biol Chem, 2002. **277**(22): p. 19855-60.
121. Beullens, M., et al., *Substrate specificity and activity regulation of protein kinase MELK*. J Biol Chem, 2005. **280**(48): p. 40003-11.
122. Boudrez, A., et al., *NIPP1-mediated interaction of protein phosphatase-1 with CDC5L, a regulator of pre-mRNA splicing and mitotic entry*. J Biol Chem, 2000. **275**(33): p. 25411-7.
123. Boudrez, A., et al., *Phosphorylation-dependent interaction between the splicing factors SAP155 and NIPP1*. J Biol Chem, 2002. **277**(35): p. 31834-41.
124. Tanuma, N., et al., *Nuclear inhibitor of protein phosphatase-1 (NIPP1) directs protein phosphatase-1 (PP1) to dephosphorylate the U2 small nuclear ribonucleoprotein particle (snRNP) component, spliceosome-associated protein 155 (Sap155)*. J Biol Chem, 2008. **283**(51): p. 35805-14.
125. Vulsteke, V., et al., *Inhibition of spliceosome assembly by the cell cycle-regulated protein kinase MELK and involvement of splicing factor NIPP1*. J Biol Chem, 2004. **279**(10): p. 8642-7.
126. Jerebtsova, M., et al., *Mass spectrometry and biochemical analysis of RNA polymerase II: targeting by protein phosphatase-1*. Mol Cell Biochem. **347**(1-2): p. 79-87.
127. Jin, Q., et al., *The protein phosphatase-1 (PP1) regulator, nuclear inhibitor of PP1 (NIPP1), interacts with the polycomb group protein, embryonic ectoderm development (EED), and functions as a transcriptional repressor*. J Biol Chem, 2003. **278**(33): p. 30677-85.
128. Roy, N., et al., *The transcriptional repression by NIPP1 is mediated by Polycomb group proteins*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1769**(9-10): p. 541-5.
129. Van Dessel, N., et al., *The phosphatase interactor NIPP1 regulates the occupancy of the histone methyltransferase EZH2 at Polycomb targets*. Nucleic Acids Res. **38**(21): p. 7500-12.
130. Nuytten, M., et al., *The transcriptional repressor NIPP1 is an essential player in EZH2-mediated gene silencing*. Oncogene, 2008. **27**(10): p. 1449-60.
131. Wera, S. and B.A. Hemmings, *Serine/threonine protein phosphatases*. Biochem J, 1995. **311** (Pt 1): p. 17-29.
132. Cohen, P.T., *Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life*. Trends Biochem Sci, 1997. **22**(7): p. 245-51.
133. Lin, Q., et al., *Molecular evolution of type 1 serine/threonine protein phosphatases*. Mol Phylogenet Evol, 1999. **12**(1): p. 57-66.
134. Bollen, M. and M. Beullens, *Signaling by protein phosphatases in the nucleus*. Trends Cell Biol, 2002. **12**(3): p. 138-45.
135. Ceulemans, H., W. Stalmans, and M. Bollen, *Regulator-driven functional diversification of protein phosphatase-1 in eukaryotic evolution*. Bioessays, 2002. **24**(4): p. 371-81.
136. Bollen, M., *Combinatorial control of protein phosphatase-1*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(7): p. 426-31.
137. Cohen, P.T., *Protein phosphatase 1--targeted in many directions*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 2): p. 241-56.

138. Wakula, P., et al., *Degeneracy and function of the ubiquitous RVXF motif that mediates binding to protein phosphatase-1*. J Biol Chem, 2003. **278**(21): p. 18817-23.
139. Trinkle-Mulcahy, L., J.E. Sleeman, and A.I. Lamond, *Dynamic targeting of protein phosphatase 1 within the nuclei of living mammalian cells*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 23): p. 4219-28.
140. Cohen, P. and P.T. Cohen, *Protein phosphatases come of age*. J Biol Chem, 1989. **264**(36): p. 21435-8.
141. Ceulemans, H. and M. Bollen, *Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button*. Physiol Rev, 2004. **84**(1): p. 1-39.
142. Hendrickx, A., et al., *Docking motif-guided mapping of the interactome of protein phosphatase-1*. Chem Biol, 2009. **16**(4): p. 365-71.
143. Aggen, J.B., A.C. Nairn, and R. Chamberlin, *Regulation of protein phosphatase-1*. Chem Biol, 2000. **7**(1): p. R13-23.
144. Lesage, B., et al., *Determinants of the nucleolar targeting of protein phosphatase-1*. FEBS Lett, 2005. **579**(25): p. 5626-30.
145. Novoyatleva, T., et al., *Protein phosphatase 1 binds to the RNA recognition motif of several splicing factors and regulates alternative pre-mRNA processing*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(1): p. 52-70.
146. Vanoosthuyse, V. and K.G. Hardwick, *A novel protein phosphatase 1-dependent spindle checkpoint silencing mechanism*. Curr Biol, 2009. **19**(14): p. 1176-81.
147. Wakula, P., et al., *The translation initiation factor eIF2beta is an interactor of protein phosphatase-1*. Biochem J, 2006. **400**(2): p. 377-83.
148. Washington, K., et al., *Protein phosphatase-1 dephosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase-II*. J Biol Chem, 2002. **277**(43): p. 40442-8.
149. Wurzenberger, C. and D.W. Gerlich, *Phosphatases: providing safe passage through mitotic exit*. Nat Rev Mol Cell Biol. **12**(8): p. 469-82.
150. Franke, S., et al., *Increased levels of advanced glycation end products in human cataractous lenses*. J Cataract Refract Surg, 2003. **29**(5): p. 998-1004.
151. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
152. Compton, S.J. and C.G. Jones, *Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay*. Anal Biochem, 1985. **151**(2): p. 369-74.
153. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
154. Ruster, C., et al., *Advanced glycation end-products induce cell cycle arrest and hypertrophy in podocytes*. Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(7): p. 2179-91.
155. Henley, S.A. and F.A. Dick, *The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle*. Cell Div. **7**(1): p. 10.
156. Bondeva, T., et al., *Advanced glycation end-products suppress neuropilin-1 expression in podocytes*. Kidney Int, 2009. **75**(6): p. 605-16.

157. Ammosova, T., et al., *Small molecules targeted to a non-catalytic "RVxF" binding site of protein phosphatase-1 inhibit HIV-1*. PLoS One. **7**(6): p. e39481.
158. Kim, S.E., et al., *Broad specificity in binding of NIPP-1, nuclear inhibitor of protein phosphatase-1, to PP1 isoforms in vivo*. Tohoku J Exp Med, 2000. **191**(1): p. 39-45.
159. Awazu, M., et al., *The lack of cyclin kinase inhibitor p27(Kip1) ameliorates progression of diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(3): p. 699-708.
160. Marshall, C.B. and S.J. Shankland, *Cell cycle regulatory proteins in podocyte health and disease*. Nephron Exp Nephrol, 2007. **106**(2): p. e51-9.
161. Kolupaeva, V. and V. Janssens, *PP1 and PP2A phosphatases - cooperating partners in modulating retinoblastoma protein activation*. FEBS J.
162. Nelson, D.A., N.A. Krucher, and J.W. Ludlow, *High molecular weight protein phosphatase type 1 dephosphorylates the retinoblastoma protein*. J Biol Chem, 1997. **272**(7): p. 4528-35.
163. Park, M.S., et al., *p27 and Rb are on overlapping pathways suppressing tumorigenesis in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(11): p. 6382-7.
164. Lu, Z. and T. Hunter, *Ubiquitylation and proteasomal degradation of the p21(Cip1), p27(Kip1) and p57(Kip2) CDK inhibitors*. Cell Cycle. **9**(12): p. 2342-52.
165. Ji, P., et al., *An Rb-Skp2-p27 pathway mediates acute cell cycle inhibition by Rb and is retained in a partial-penetrance Rb mutant*. Mol Cell, 2004. **16**(1): p. 47-58.
166. Ludlow, J.W. and D.A. Nelson, *Control and activity of type-1 serine/threonine protein phosphatase during the cell cycle*. Semin Cancer Biol, 1995. **6**(4): p. 195-202.
167. Reidy, K. and K. Susztak, *Epithelial-mesenchymal transition and podocyte loss in diabetic kidney disease*. Am J Kidney Dis, 2009. **54**(4): p. 590-3.
168. Chuang, P.Y. and J.C. He, *Signaling in regulation of podocyte phenotypes*. Nephron Physiol, 2009. **111**(2): p. p9-15.
169. Spurney, R.F. and T.M. Coffman, *Stressed-out podocytes in diabetes?* J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(11): p. 2035-7.
170. Yu, D., et al., *Urinary podocyte loss is a more specific marker of ongoing glomerular damage than proteinuria*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(6): p. 1733-41.
171. Ashall, L., et al., *Pulsatile stimulation determines timing and specificity of NF-kappaB-dependent transcription*. Science, 2009. **324**(5924): p. 242-6.
172. Nelson, D.E., et al., *Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression*. Science, 2004. **306**(5696): p. 704-8.
173. Gesundheitsbericht Diabetes 2012. 212 Seiten; Herausgeber diabetesDE; ISSN 1614-824X; Verlag Kirchheim + Co GmbH, Mainz. Abrufbar im Internet: http://www.diabetesde.org/fileadmin/users/Patientenseite/PDFs_und_TEXTE/Infomaterial/Gesundheitsbericht_2012.pdf; Abrufdatum 14.01.2013.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Marita Liebisch, erkläre hiermit, dass

- mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe, keine Textabschnitte Dritter ohne Kennzeichnung übernommen habe,
- ich alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in der Arbeit angegeben habe,
- mich Prof. Wolf und Dr. Bondeva bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben,
- ich keine Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen habe und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe,
- ich nicht die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 20.03.2013

Marita Liebisch

Danksagung

Ein großer Dank gilt all denen, die direkt und indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich unterstützt haben.

Ich möchte mich besonders bei Prof. Wolf dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, das interessante Promotionsthema in der KIM III des Universitätsklinikum Jenas zu bearbeiten. Weiterhin will ich ihm für die stets konstruktiven Anstöße zur Durchführung meiner Arbeit danken.

Zudem möchte ich mich bei Dr. Bondeva für die gute Betreuung während meiner Promotion bedanken. Durch ihre ständige Bereitschaft zu wissenschaftlichen Diskussionen hat Sie wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Ich möchte PD Dr. Jörg Müller (Institut für Molekulare Zellbiologie, FSU Jena) für die förderlichen Gespräche danken. Durch seinen „Blick von außen“ hat er mir oft hilfreiche Hinweise geben können.

Meinen Dank möchte ich auch gegenüber PD Dr. Franke und Dr. Löffler für ihre Unterstützung in allen Belangen zum Ausdruck bringen.

Ich möchte meinen Kollegen der Arbeitsgruppe KIM III im Forschungszentrum Lobeda für die gute Zusammenarbeit und das familiäre Arbeitsklima danken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Familie für ihre Unterstützung und bei meinem Lebensgefährten für die Motivation und seine Geduld bedanken, die mir in dieser Zeit viel Kraft gegeben haben.